



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO**



**SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE**

**CICLO XXVII**

**Anno Accademico 2013/2014**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA**

**Settore scientifico disciplinare**

**BIO12**

**Le alterazioni della matrice extracellulare nella patogenesi  
dell'ipertensione: effetti della carenza di Emilina-1 a livello  
dell'aorta e delle arterie mesenteriche di topo**

**Dottorando:** Laura BARBALINI

Matricola N° R09547

**TUTORE:** Prof.ssa Cecilia GELFI

**COORDINATORE DEL DOTTORATO:** Ch.mo Prof. Mario CLERICI



## SOMMARIO

*L'ipertensione arteriosa è uno dei principali fattori di rischio per le patologie cardiovascolari. Più del 90% dei soggetti ipertesi è affetto da ipertensione essenziale, cioè ad eziologia non definita a parte la possibile predisposizione genetica, in cui l'aumento dei valori pressori sembra essere associato ad un aumento della resistenza arteriolare. L'integrità e l'elasticità di questi vasi come anche la modulazione della pressione arteriosa sono determinate dalle cellule muscolari lisce ed endoteliali che ne rivestono la parete e dalle loro connessioni con la matrice extracellulare. In quest'ultima è stata individuata una glicoproteina secreta, l'Emilina-1, che regola la pressione arteriosa inibendo il processamento del fattore di crescita TGF- $\beta$ . In seguito alla mancanza di Emilina-1 nelle cellule muscolari lisce dei vasi, topi knockout presentano elevati livelli di TGF- $\beta$  e un aumento del tono miogeno.*

*Con l'obiettivo di comprendere le alterazioni molecolari che portano ad ipertensione arteriosa in seguito alla carenza di Emilina-1 sono stati analizzati i profili proteomici dell'aorta e delle arterie mesenteriche di due modelli animali: i topi Emilina-1 knockout (KO) e i topi Emilina-1 condizionali indotti da Tamoxifen (flox-flox), utilizzando come controlli rispettivamente topi sani e topi trattati con Tamoxifen. Le differenze qualitative e quantitative del proteoma sono state ottenute mediante la combinazione di due tecniche: la 2D-DIGE (Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis) e l'ICPL (Isotope-Coded Protein Labeling). Inoltre per studiare la regolazione delle proteine differenzialmente espresse identificate, sui promotori dei relativi geni è stata effettuata un'analisi di arricchimento in silico dei siti di legame dei fattori di trascrizione.*

*I risultati ottenuti nel modello Emilina-1 KO mostrano una down-regolazione di gran parte delle proteine cellulari associata ad una disregolazione metabolica, alla perdita delle proteine citoscheletriche e all'attivazione di meccanismi per contrastare la rigidità vasale. In questi topi la proteina Emilina-1 non si esprime né nelle cellule endoteliali, né nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi e questi ultimi risultano costitutivamente più piccoli rispetto ai controlli. Questi risultati riflettono la presenza di una muscolatura liscia adattata ad una condizione di ipertensione congenita.*

*Il modello Emilina-1 flox-flox invece è caratterizzato da una up-regolazione di alcune proteine cellulari coinvolte nella produzione di energia, nell'attività contrattile e nella trascrizione genica di proteine del citoscheletro e della matrice extracellulare. Le variazioni riscontrate in questi topi, in cui l'espressione di Emilina-1 viene silenziata solo nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi dopo la nascita, dimostrano che in questo modello è presente una correlazione tra l'instaurazione di uno stato ipertensivo e la carenza di Emilina-1.*

*L'analisi dei siti di legame dei fattori di trascrizione ha invece messo in evidenza che in entrambi i modelli si verificano modificazioni della struttura della cromatina che portano alla trascrizione di geni specifici del fenotipo contrattile delle cellule muscolari lisce dei vasi. Queste cellule presentano infatti la capacità di modificare il proprio fenotipo in seguito a cambiamenti della pressione arteriosa e ad aumenti dei livelli di TGF- $\beta$ .*

*Ulteriori avanzamenti saranno possibili approfondendo i meccanismi patofisiologici associati alla carenza di Emilina-1, considerando i risultati ottenuti dall'analisi*

*proteomica e di arricchimento dei siti di legame dei fattori di trascrizione. Tuttavia, perché questi siano rilevanti per la salute umana, sono necessarie delle validazioni su soggetti ipertesi. In questo modo, sarà possibile identificare nuovi bersagli per la prevenzione e/o la terapia dell'ipertensione arteriosa.*

## ABSTRACT

*Hypertension is a major risk factor for cardiovascular diseases. About 90% of cases are classified as essential hypertension, which means high blood pressure with no obvious underlying medical cause unless genetic factors. In these individuals hypertension is due to an increase of vascular resistance. The integrity and elasticity of vessels and the modulation of blood pressure are determined by smooth muscle cells and endothelial cells lining the vascular walls and by their relationship with extracellular matrix. Emilin1, an extracellular matrix glycoprotein, regulates blood pressure by inhibiting transforming growth factor TGF- $\beta$ 1 processing. When Emilin-1 is not expressed in vascular smooth muscle cells, Emilin-1 knockout mice are characterized by an increase of TGF- $\beta$ 1 signaling and arteriolar myogenic response.*

*To understand molecular bases of Emilin-1 deficiency in hypertension, we examined the proteomic profiles of aorta and mesenteric arteries in two animal models: constitutive Emilin-1 knockout mouse (KO) and Tamoxifen-inducible vascular smooth muscle cells specific knockout mouse (flox-flox). Wild-type mice and mice Tamoxifen-treated, respectively, were used as controls. Qualitative and quantitative proteomic differences were obtained combining two proteomics techniques: 2D-DIGE (Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis) and ICPL (Isotope-Coded Protein Labeling). To study the transcriptional regulation of the identified differentially expressed proteins, a transcription factor binding sites enrichment analysis was performed.*

*Results indicate that in Emilin-1 KO model there is a general down-regulation of cellular proteins associated with metabolic dysregulation, loss of cytoskeletal proteins and reduction of vascular stiffness. In these mice Emilin-1 gene is expressed neither in smooth muscle nor in endothelial cells and blood vessels are constitutively smaller than controls. These results indicate that the KO model reflects the adaptation of smooth muscle to a congenital hypertension.*

*Emilin-1 flox-flox model shows an up-regulation of some cellular proteins related to energy production, contractile activity and transcription of cytoskeletal and extracellular matrix proteins. In these mice, the conditional silencing of Emilin-1 gene is restricted to smooth muscle cells of blood vessels. The observed molecular alterations demonstrate, in this model, a direct association between hypertension and Emilin-1 deficiency.*

*The transcription factor binding sites enrichment analysis shows that in both models, changes in chromatin structure induce genes expression of contractile markers of vascular smooth muscle cells. These cells may shift their phenotype in response to changes in blood pressure and TGF- $\beta$  levels.*

*Further progresses will be possible analyzing the pathophysiological mechanisms associated to Emilin-1 deficiency by considering proteomic and transcription factors binding sites enrichment analysis. However, to become relevant for human health, a validation in human subject is mandatory. In this way, these results can promote the identification of new targets for the prevention and/or treatment of hypertension.*



## INDICE

1.	LISTA DEI SIMBOLI .....	IX
2.	LISTA DELLE FIGURE.....	XI
3.	LISTA DELLE TABELLE.....	XV
4.	INTRODUZIONE .....	1
4.1	<b>L'ipertensione arteriosa .....</b>	<b>1</b>
4.1.1	Eziologia .....	1
4.1.1.1	<i>Principali meccanismi alla base dell'ipertensione arteriosa.....</i>	<i>4</i>
4.2	<b>La struttura delle arterie.....</b>	<b>6</b>
4.2.1	La plasticità fenotipica delle cellule muscolari lisce .....	7
4.2.1.1	<i>I marcatori del fenotipo delle cellule muscolari lisce.....</i>	<i>8</i>
4.2.1.2	<i>I meccanismi di regolazione del fenotipo delle cellule muscolari lisce.....</i>	<i>9</i>
4.2.1.3	<i>I meccanismi di contrazione delle cellule muscolari lisce.....</i>	<i>12</i>
4.2.2	La matrice extracellulare.....	17
4.2.2.1	<i>Le alterazioni della struttura vasale.....</i>	<i>19</i>
4.3	<b>Emilina-1.....</b>	<b>21</b>
4.3.1	Effetti delle carenze di Emilina-1 sulla pressione arteriosa...22	
4.3.1.1	<i>TGF-<math>\beta</math>.....</i>	<i>23</i>
4.3.1.2	<i>Gli effetti di TGF-<math>\beta</math>1 sui vasi sanguigni.....</i>	<i>25</i>
4.4	<b>La proteomica in ipertensione .....</b>	<b>25</b>
4.4.1	La proteomica.....	26
4.4.2	Metodologie in proteomica.....	27
4.4.2.1	<i>L'elettroforesi bidimensionale.....</i>	<i>28</i>
4.4.2.2	<i>I limiti dell'elettroforesi bidimensionale .....</i>	<i>29</i>

4.4.2.3	<i>Metodologie basate sul legame di isotopi stabili</i>	30
<b>5.</b>	<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b><i>Modello sperimentale e prelievo del tessuto</i></b>	<b>39</b>
<b>6.2</b>	<b><i>Tecnica 2D-DIGE</i></b>	<b>39</b>
6.2.1	Estrazione proteica	40
6.2.2	Preparazione dei campioni alla marcatura	41
6.2.3	Marcatura dei campioni	42
6.2.4	Prima dimensione: isoelettrofocalizzazione	42
6.2.5	Equilibratura delle strip	43
6.2.6	Seconda dimensione: SDS-PAGE	44
6.2.7	Acquisizione delle immagini	45
6.2.8	Analisi delle immagini	46
6.2.8.1	<i>Il modulo DIA (Differential In-gel Analysis)</i>	47
6.2.8.2	<i>Il modulo BVA (Biological Variation Analysis)</i>	47
6.2.8.3	<i>Il modulo EDA (Extended Data Analysis)</i>	48
<b>6.3</b>	<b><i>Identificazione delle proteine</i></b>	<b>49</b>
6.3.1	Separazione bidimensionale	50
6.3.2	Colorazione con Lava Purple	50
6.3.3	Acquisizione e analisi delle immagini	51
6.3.4	Spot Picker	52
6.3.5	Idrolisi in situ ed analisi mediante spettrometria di massa	52
<b>6.4</b>	<b><i>Tecnica ICPL</i></b>	<b>54</b>
6.4.1	Estrazione proteica	54
6.4.2	Preparazione dei campioni alla marcatura	55
6.4.3	Marcatura dei campioni	55
6.4.4	Controllo della marcatura	56
6.4.5	Riduzione della complessità della miscela proteica	58
6.4.6	Idrolisi in situ ed analisi mediante spettrometria di massa	59



6.5	<b><i>Analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione</i></b>	<b>61</b>
7.	<b>RISULTATI</b>	<b>65</b>
7.1	<b><i>Disegno sperimentale</i></b>	<b>65</b>
7.2	<b><i>Analisi proteomica 2D-DIGE</i></b>	<b>66</b>
7.2.1	Analisi statistica	66
7.2.1.1	<i>Analisi statistica delle arterie mesenteriche</i>	68
7.2.1.2	<i>Analisi statistica dell'aorta</i>	70
7.2.2	Identificazioni proteiche	73
7.2.2.1	<i>Identificazioni proteiche delle arterie mesenteriche</i>	75
7.2.2.2	<i>Identificazioni proteiche dell'aorta</i>	80
7.3	<b><i>Analisi proteomica ICPL dell'aorta</i></b>	<b>90</b>
7.3.1	Controllo dell'efficienza della marcatura	91
7.3.2	Analisi ICPL dell'aorta	93
7.3.2.1	<i>Identificazioni proteiche dell'aorta</i>	95
7.4	<b><i>Analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione nell'aorta</i></b>	<b>100</b>
7.4.1	Analisi di arricchimento dei TFBS nelle proteine dell'aorta identificate mediante 2D-DIGE	100
7.4.2	Analisi di arricchimento dei TFBS nelle proteine dell'aorta identificate mediante ICPL	102
8.	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>105</b>
8.1	<b><i>I cambiamenti del proteoma dei piccoli e grandi vasi in carenza di Emilina-1</i></b>	<b>105</b>
8.1.1	Le alterazioni del metabolismo cellulare	105
8.1.2	Le alterazioni della contrazione cellulare	108
8.1.3	La regolazione dell'espressione genica	110
9.	<b>CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE</b>	<b>113</b>

10.	BIBLIOGRAFIA .....	115
11.	APPENDICI.....	123
12.	PRODOTTI SCIENTIFICI DEL DOTTORANDO .....	141
13.	RINGRAZIAMENTI .....	143

## 1. LISTA DEI SIMBOLI

**2D-DIGE** *two dimensional Differential In Gel Electrophoresis*

**ACN** aceto nitrile

**aCSA** *Anchored Combination Site Analysis*

**aCTCA** *Anchored Combination TFBS Cluster Analysis*

**ADP** adenosine difosfato

**ALK** *activin receptor-like kinase*

**AMBIC** ammonio bicarbonato

**APS** ammonio persolfato

**BSA** *bovine serum albumin*

**BVA** *Biological Variation Analysis*

**CHAPS** 3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonate Hydrate.

**CHCA**  $\alpha$ -Ciano

**CID** *Collision Induced Dissociation*

**DIA** *Differential In-gel Analysis*

**DNA** acido desossido ribonucleico

**DTT** ditiotreitolo

**EC** *endothelial cell*

**ECM** *extracellular matrix*

**EDA** *Extended Data Analysis*

**ESI** Ionizzazione electrospray

**FA** Acido formico

**HPLC** *high-performance liquid chromatography*

**ICAT** *Isotope Coded Affinity Tagging*

**ICPL** *Isotope-Coded Protein Label*

**IEF** isoelettrofocalizzazione

**KO** *knockout*

**LAP** *latency-associated protein*

**m/z** rapporto massa/carica

**MALDI** Ionizzazione laser assistita da matrice

**MS** Spettrometria di massa

**NAD** *Nicotinamide adenine dinucleotide*

**NO** ossido nitrico

**PCA** *Principal components analysis*

**pI** punto isoelettrico

**PMF** *Peptide Mass Fingerprinting*  
**PMSF** *phenylmethanesulfonylfluoride*  
**PMT** fotomoltiplicatore  
**POI** *protein of interest*  
**SDS** *Sodium dodecyl sulfate*  
**SILAC** *Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture*  
**SILE** *stable isotope labeling*  
**SMC** *smooth muscle cell*  
**SRF** *serum response factor*  
**SSA** *Single Site Analysis*  
**TCA** *TFBS Cluster Analysis*  
**TEMED** *N,N,N,N'- tetramethylethylene-diamine*  
**TFBS** *Transcription Factor Binding Sites*  
**TOF** *Tempo di volo*  
**vs** *versus*

Gli acronimi delle proteine, che sono state identificate con la spettrometria di massa, sono presenti nelle tabelle in appendice.

## 2. LISTA DELLE FIGURE

Figura 1: Schema dei principali danni d'organo causati da ipertensione arteriosa. .	2
Figura 2: Fattori di rischio per l'insorgenza di ipertensione arteriosa. ....	3
Figura 3: Interazione tra fattori genetici e ambientali nello sviluppo dell'ipertensione. ....	4
Figura 4: Meccanismo molecolare alla base della regolazione dell'espressione genica dei marker di differenziamento delle SMC. ....	10
Figura 5: Regolazione epigenetica dell'espressione genica nelle SMC. ....	11
Figura 6: Schema delle risposte cellulari attivate nelle SMC in risposta ad un incremento di $Ca^{2+}$ . ....	13
Figura 7: Schema delle risposte cellulari attivate nelle SMC dal <i>signaling</i> delle Rho chinasi. ....	14
Figura 8: Meccanismi che attivano la contrazione cellulare delle SMC. ....	15
Figura 9: Meccanismo di contrazione cellulare delle SMC basato sul rimodellamento del citoscheletro. ....	16
Figura 10: Organizzazione molecolare delle giunzioni di adesione nelle SMC in seguito ad uno stimolo esterno. ....	17
Figura 11: Componenti strutturali della tonaca intermedia dell'aorta. ....	19
Figura 12: Struttura di Emilina-1. ....	21
Figura 13: Meccanismo di inibizione del processamento di TGF- $\beta$ da parte di Emilina-1 nella parete vascolare. ....	23
Figura 14: Meccanismo di trasduzione del segnale attivato da TGF- $\beta$ . ....	24
Figura 15: Schema di un classico approccio proteomico. ....	28
Figura 16: Step di un esperimento SILAC. ....	31
Figura 17: Step di un esperimento ICAT. ....	33

Figura 18: Chimica dei reagenti ICPL.....	34
Figura 19: Step di un esperimento ICPL. ....	36
Figura 20: Schema dei principali tipi di analisi disponibili in <i>oPOSSUM 3.0</i> . ....	62
Figura 21: Disegno sperimentale: schema dei modelli animali E1KO e flox-flox. ..	65
Figura 22: PCA dei gruppi E1KO, C57, flox-flox e wt nell'analisi 2D-DIGE delle arterie mesenteriche. ....	68
Figura 23: Mappe 2D-DIGE delle arterie mesenteriche di topo E1KO e flox-flox. .	70
Figura 24: PCA dei gruppi E1KO, C57, flox-flox e wt nell'analisi 2D-DIGE di aorta. ....	71
Figura 25: Mappe 2D-DIGE dell'aorta di topo E1KO e flox-flox. ....	73
Figura 26: Mappe preparative di arterie mesenteriche e aorta di topo. ....	74
Figura 27: Profilo proteomico delle arterie mesenteriche dei topi E1KO mediante 2D-DIGE. ....	76
Figura 28: Schema delle variazioni metaboliche nelle arterie mesenteriche del modello E1KO.....	78
Figura 29: Profilo proteomico delle arterie mesenteriche dei topi flox-flox mediante 2D-DIGE. ....	79
Figura 30: Profilo proteomico dell'aorta dei topi E1KO mediante 2D-DIGE.....	80
Figura 31: Schema delle variazioni metaboliche nell'aorta del modello E1KO. ....	82
Figura 32: Schema delle variazioni proteiche della $\beta$ -ossidazione nell'aorta del modello E1KO.....	83
Figura 33: Alterazioni proteiche identificate mediante 2D-DIGE a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello E1KO. ....	85
Figura 34: Profilo proteomico dell'aorta dei topi flox-flox mediante 2D-DIGE. ....	86
Figura 35: Schema delle variazioni metaboliche nell'aorta del modello flox-flox. ..	87

Figura 36: Schema delle variazioni proteiche della $\beta$ -ossidazione nell'aorta del modello flox-flox.....	88
Figura 37: Alterazioni proteiche identificate mediante 2D-DIGE a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello flox-flox. ....	89
Figura 38: Step sperimentali dell'analisi proteomica mediante tecnologia ICPL eseguita sui campioni di aorta dei topi E1KO, C57, flox-flox e wt. ....	91
Figura 39: Spettro di massa di un peptide della <i>Carbonic Anhydrase II</i> identificato dalla miscela di quattro Protein Mix marcate con i quattro reagenti isotopici ICPL.	92
Figura 40: Gel monodimensionale per ridurre la complessità della miscela dei campioni marcati con ICPL.....	93
Figura 41: Classificazione in classi funzionali delle proteine differenzialmente espresse nell'aorta dei topi E1KO identificate mediante tecnologia ICPL. ....	96
Figura 42: Alterazioni proteiche identificate mediante ICPL a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello E1KO. ....	97
Figura 43: Classificazione in classi funzionali delle proteine differenzialmente espresse nell'aorta dei topi flox-flox identificate mediante tecnologia ICPL.....	98
Figura 44: Alterazioni proteiche identificate mediante ICPL a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello flox-flox. ....	99





### 3. LISTA DELLE TABELLE

Tabella 1: Protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione.....	43
Tabella 2: Protocollo utilizzato per l'SDS-PAGE. ....	45
Tabella 3: Schema marcatura campioni con isotopi ICPL.....	56
Tabella 4: Composizione Protein Mix per ICPL ( <i>SERVA</i> ). ....	57
Tabella 5: Raggruppamento dei gel nei gruppi sperimentali. ....	67
Tabella 6: Riassunto del numero di macchie differenzialmente espresse nelle arterie mesenteriche nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli. ....	69
Tabella 7: Riassunto del numero di macchie differenzialmente espresse nell'aorta nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli. ....	72
Tabella 8: Abbondanza relativa della Carbonic Anhydrase II nelle Protein Mix per ICPL ( <i>SERVA</i> ). ....	93
Tabella 9: Riassunto del numero di proteine differenzialmente espresse nell'aorta nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli, identificate mediante tecnologia ICPL. ....	95
Tabella 10: Elenco dei fattori di trascrizione che presentano siti di legame arricchiti nei geni che codificano per le proteine statisticamente variare identificate mediante 2D-DIGE. ....	101
Tabella 11: Elenco dei fattori di trascrizione che presentano siti di legame arricchiti nei geni che codificano per le proteine statisticamente variare identificate mediante ICPL. ....	103

#### ***Tabelle appendici***

Tabella appendice 1: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variare identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi E1KO vs topi C57. ....	123
--	-----

Tabella appendice 2: Elenco delle proteine significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 .....	124
Tabella appendice 3: Elenco delle proteine significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt. ....	125
Tabella appendice 4: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 .....	126
Tabella appendice 5: Elenco delle proteine significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 .....	129
Tabella appendice 6: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt .....	131
Tabella appendice 7: Elenco delle proteine significativamente variate identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt. ....	133
Tabella appendice 8: Elenco delle proteine variate identificate mediante ICPL nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 .....	135
Tabella appendice 9: Elenco delle proteine variate identificate mediante ICPL nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt.....	136
Tabella appendice 10: Elenco delle proteine identificate mediante 2D-DIGE i cui geni presentano siti di legame arricchiti per i fattori di trascrizione SRF e KLF4. ....	137
Tabella appendice 11: Elenco delle proteine identificate mediante ICPL i cui geni presentano siti di legame arricchiti per i fattori di trascrizione SRF e KLF4.....	139

## **4. INTRODUZIONE**

### **4.1 *L'ipertensione arteriosa***

L'ipertensione arteriosa è una delle più comuni malattie croniche nella popolazione umana, che affligge più di un bilione di persone nel mondo [1]. Le sue complicazioni, quali l'infarto al miocardio, l'ictus e l'insufficienza renale, sono tra le maggiori cause dei decessi annuali. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha infatti identificato questa patologia come la causa principale di mortalità cardiovascolare e l'ha inclusa tra le malattie non trasmissibili da prevenire [2].

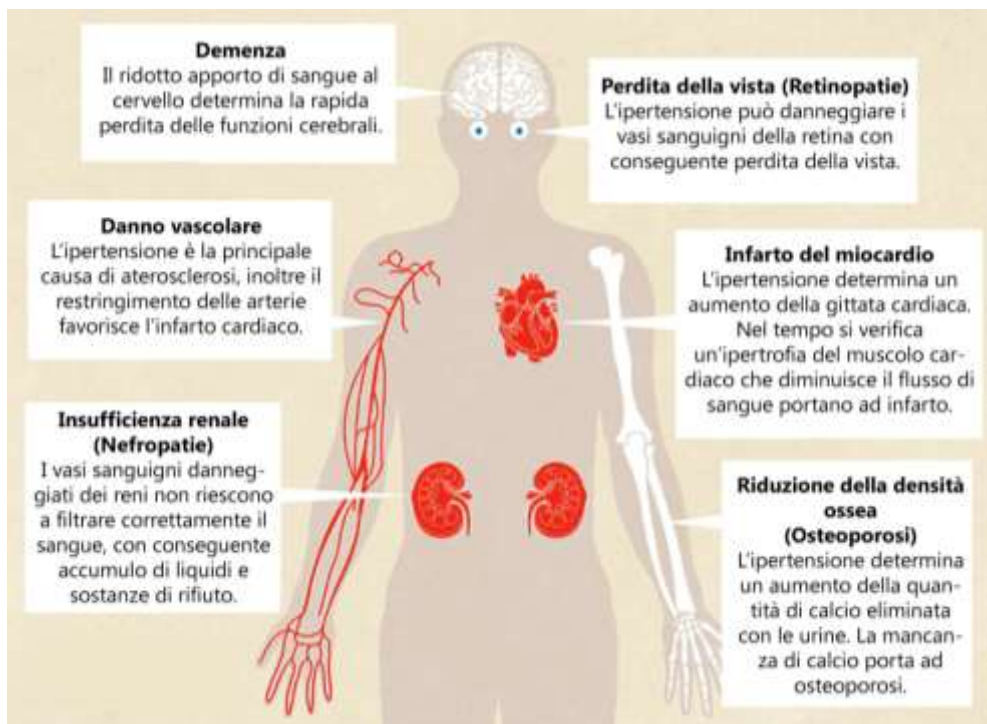
Nonostante la sua alta prevalenza e l'interesse pubblico per la sua prevenzione, i risultati ottenuti non permettono di controllarne la diffusione. L'identificazione di soggetti geneticamente predisposti e una correzione degli stili di vita, prima della manifestazione di eventi acuti o complicanze a lungo termine, può essere efficace per introdurre o evitare un trattamento farmacologico; ma problemi sanitari, come il libero accesso alle cure, la corretta diagnosi e la necessità di implementare le terapie esistenti, non permettono di raggiungere gli obiettivi posti dalle linee guida internazionali. Il persistere di questo problema è dovuto soprattutto alla mancanza di conoscenze riguardanti la patogenesi della malattia. L'eziologia di molti pazienti è infatti difficile da determinare e risulta complicato individuare le terapie ottimali o predirne la prognosi. Per questo motivo comprendere i processi biologici alla base dell'ipertensione arteriosa resta il principale obiettivo per favorirne la prevenzione.

#### **4.1.1 Eziologia**

Un soggetto viene definito iperteso quando la sua pressione sistolica massima supera i 140 mm Hg e/o la diastolica minima supera i 90 mm Hg, in seguito a due o più misurazioni a distanza di tempo [3].

Più del 90% dei soggetti ipertesi è affetto da ipertensione essenziale o

primaria, cioè ad eziologia non definita a parte la possibile predisposizione genetica. Il restante 10% presenta un'ipertensione secondaria ad altre patologie che interessano i reni, le arterie, il cuore e il sistema endocrino. Nonostante l'apparato circolatorio sia sottoposto ad un continuo sovraccarico di lavoro, il soggetto appare asintomatico finché non compaiono i primi danni d'organo (figura 1).



**Figura 1: Schema dei principali danni d'organo causati da ipertensione arteriosa.**

Le cause della patologia sono poco conosciute, ma alterazioni genetiche e fattori ambientali sono stati correlati ad essa. Studi epidemiologici hanno messo in evidenza che l'insorgenza dell'ipertensione arteriosa in un individuo è associata alla coesistenza di fattori di rischio [4], che possono essere di tipo fisiologico (sesso, età, etnia, fattori genetici, ecc...) o

correggibili (sovrappeso corporeo, inattività fisica, abuso di alcol o fumo, ecc...) (figura 2). Figli di ipertesi hanno una maggiore probabilità di sviluppare ipertensione rispetto ai figli di normotesi, allo stesso modo abitudini di vita non corrette ne favoriscono lo sviluppo.



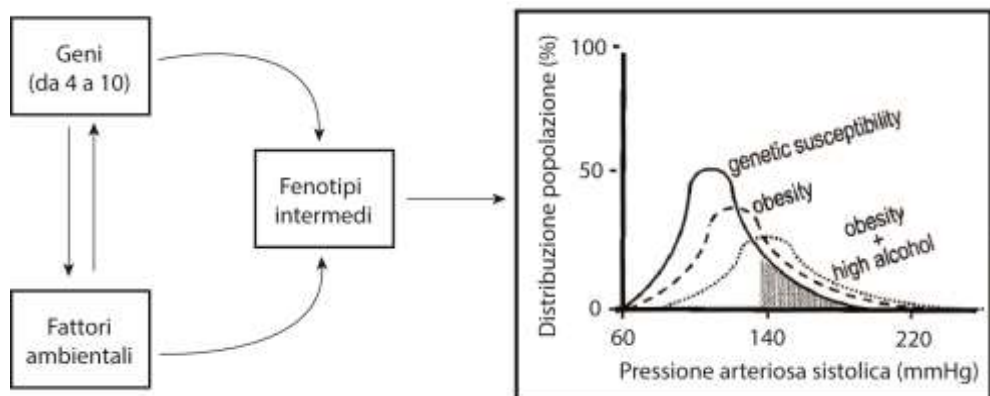
**Figura 2: Fattori di rischio per l'insorgenza di ipertensione arteriosa.**

L'ipertensione arteriosa si manifesta principalmente in soggetti adulti, di razza nera, maschi (anche se dopo la menopausa la prevalenza aumenta anche nelle donne). Inoltre lo stato sociale, che è un indice delle abitudini di vita, è uno dei fattori che ne determina l'insorgenza.

La coesistenza di più fattori di rischio determina l'esistenza di differenti fenotipi. L'interazione di componenti genetiche e ambientali porta alla manifestazione di fenotipi intermedi che influenzano i valori pressori (figura 3). L'attività del sistema nervoso simpatico, il sistema renina-angiotensina-

aldosterone e componenti dell'endotelio controllano l'eliminazione del sodio, la reattività vascolare e la contrazione cardiaca. Questi e altri fenotipi intermedi determinano un aumento della resistenza vascolare e della gittata cardiaca, due dei principali meccanismi alla base dell'ipertensione arteriosa.

Riconoscere quali fattori di rischio coesistono in un paziente risulta importante per eliminarli, in modo da prevenire un danno d'organo. Quando questi non possono essere ridotti, come nel caso dell'età, l'individuazione permette di valutare un trattamento farmacologico o un cambiamento degli stili di vita [5].



**Figura 3: Interazione tra fattori genetici e ambientali nello sviluppo dell'ipertensione.**

Fattori ambientali e più geni sono responsabili dello sviluppo di fenotipi intermedi. Il risultato di queste interazioni determina l'aumento dei valori pressori. Immagine modificata dal lavoro di Carretero e al. 2000 [5].

#### ***4.1.1.1 Principali meccanismi alla base dell'ipertensione arteriosa***

L'apparato circolatorio è un sistema chiuso che ha lo scopo di fornire l'adeguato apporto di ossigeno e nutrienti ai tessuti corporei e di eliminare i prodotti metabolici di scarto. La pressione arteriosa dipende dalle proprietà emodinamiche di questo sistema: essa è dovuta ad un equilibrio tra la

quantità di sangue che, pompato dal cuore, entra nelle arterie e la quantità che ne esce. Il flusso di sangue in entrata nell'aorta corrisponde alla gittata cardiaca del ventricolo sinistro. Il flusso in uscita dalle arterie è influenzato principalmente dalla resistenza periferica, definita come la resistenza offerta dalle arteriole. Altri fattori che possono influenzare la pressione arteriosa sono il volume ematico totale, la grandezza, la struttura e la distensibilità dei vasi [6].

Al momento della diagnosi di ipertensione, solitamente la gittata cardiaca è normale e la pressione elevata sembra essere associata ad un aumento delle resistenze periferiche.

La resistenza arteriolare è controllata da diversi meccanismi [7]:

- i riflessi ortosimpatici, mediati dal sistema nervoso centrale, che regolano la distribuzione del sangue per soddisfare alcune necessità omeostatiche;
- l'autoregolazione miogena, cioè la capacità del muscolo liscio di aumentare il proprio stato di contrazione per ridurre il flusso ematico che attraversa il vaso;
- agenti paracrini, rilasciati dall'endotelio vasale o dalle cellule irrorate (come NO o l'Endotelina-1);
- ormoni, come l'angiotensina II la quale aumenta la pressione arteriosa mediante cinque ulteriori meccanismi. (1) Attiva la via renina-angiotensina-aldosterone che controlla il bilancio del sodio e quindi l'osmolarità e il volume ematico. (2) Aumenta la secrezione di vasopressina che favorisce la ritenzione di acqua nei reni (3) Stimola la sete, con conseguente aumento del volume del sangue. (4) È un vasocostrittore. (5) Aumenta l'attività simpatica sul cuore e sui vasi sanguigni, con conseguente incremento della gittata cardiaca e vasocostrizione.

In seguito alla persistenza di uno stato di ipertensione si verifica un

adattamento dei recettori responsabili della regolazione dei valori pressori, i barocettori, i quali non innescano più riflessi finalizzati alla diminuzione della resistenza periferica e della gittata cardiaca. Il muscolo cardiaco si ipertrofizza, l'elasticità dei vasi si riduce e il deposito di colesterolo o acidi grassi sulle pareti porta alla loro occlusione. Il protrarsi di questa condizione porta così al danno d'organo descritto precedentemente.

#### **4.2 La struttura delle arterie**

La parete delle arterie è costituita da tessuto muscolare liscio, tessuto connettivo elastico e tessuto connettivo fibroso. Ogni vaso presenta internamente un sottile strato di endotelio circondato da una membrana basale, che formano la cosiddetta tonaca intima. Attorno a questa si dispongono diversi strati di tessuto connettivo e muscolo liscio, il cui spessore varia a seconda del tipo di arteria, costituendo rispettivamente la tonaca media e avventizia.

L'ipertensione arteriosa è caratterizzata da un restringimento del diametro delle arterie con un aumento della resistenza periferica [8]. Per questo motivo gli studi scientifici hanno concentrato la loro attenzione sulle cellule endoteliali (EC, *endotelial cell*) e muscolari lisce (SMC, *smooth muscle cell*) che rivestono la parete dei vasi.

Le EC partecipano al controllo del tono vasale attraverso la produzione di fattori vasoattivi che agiscono sulla muscolatura liscia. Questa proprietà è legata alla loro struttura: deformazioni dovute al flusso sanguigno, alla pressione arteriosa o alla vasocostrizione determinano l'attivazione di vie di segnale intracellulari. Il rilascio di molecole vasoattive controlla lo stato di contrazione della muscolatura, regolando il diametro del vaso [9].

Le SMC attivano processi di contrazione e rilassamento, in risposta ai segnali esterni. La loro disposizione, perpendicolare rispetto all'asse longitudinale del vaso, permette di modificare il tono vasale senza



influenzare la lunghezza del vaso stesso. Queste cellule presentano inoltre la capacità di modificare il proprio fenotipo in base alle esigenze del tessuto. Cambiamenti nel fenotipo sono associati a specifiche caratteristiche e allo sviluppo di alcune malattie vascolari, tra cui l'ipertensione [10].

#### **4.2.1 La plasticità fenotipica delle cellule muscolari lisce**

Le SMC adulte mantengono la loro capacità di modificare il proprio fenotipo in seguito a cambiamenti dell'omeostasi, della pressione arteriosa o a danni della parete vascolare [11]. Queste cellule evolvono durante la vasculogenesi da periciti, cellule proliferanti dette sintetiche, che producono proteine della matrice extracellulare ed enzimi, a cellule mature che presentano un fenotipo quiescente caratterizzato dall'espressione di proteine contrattili.

Le cellule mature contrattili presentano (1) un apparato contrattile che risponde rapidamente a piccoli segnali molecolari, (2) un citoplasma ricco di miofilamenti e povero di reticolo endoplasmatico rugoso, apparato di Golgi e ribosomi liberi, (3) una bassa proliferazione e (4) una morfologia fusiforme [12-15]. Esse esprimono un repertorio di proteine contrattili, canali ionici e molecole di segnale specifiche per la contrazione cellulare. In seguito ad un danno vascolare, queste cellule sono in grado di revertire il loro fenotipo ritrasformandosi in sintetiche. Queste ultime sono caratterizzate da (1) un'intensa sintesi di matrice extracellulare, (2) un citoplasma privo di strutture contrattili ma con un esteso reticolo endoplasmatico rugoso, apparato di Golgi e ribosomi, (3) un'elevata proliferazione e (4) una forma più espansa, definita "a colline e vallate" [12-15]. Queste cellule sono specializzate nella secrezione di componenti della matrice extracellulare, come il collagene e l'elastina, che determinano le proprietà elastiche dei vasi.

Le SMC sintetiche possono riacquisire caratteristiche del fenotipo contrattile, suggerendo che la trasformazione può avvenire in entrambe le direzioni [12, 16-22]. In molti vasi infatti sono presenti contemporaneamente entrambi i fenotipi. L'80-90% del citoplasma delle piccole arterie è occupato da miofilamenti, mentre vasi più grandi, come l'aorta, ne contengono solo il 60-70%, presentando funzioni sia contrattili che sintetiche.

La plasticità fenotipica delle SMC mature è una caratteristica ereditaria che conferisce un vantaggio per la sopravvivenza negli organismi complessi. Tuttavia, essa predispone queste cellule ad un cambiamento fenotipico in risposta a segnali ambientali, favorendo il possibile sviluppo o la progressione di una patologia vascolare [10, 23]. Per esempio, in ipertensione le alterazioni dell'ambiente circostante determinano un aumento della contrazione cellulare, con un restringimento dei vasi e la produzione di proteine specifiche del fenotipo contrattile, per contrastare l'aumento della pressione arteriosa.

#### **4.2.1.1 I marcatori del fenotipo delle cellule muscolari lisce**

Il differenziamento delle SMC dipende dall'interazione di segnali ambientali locali, come forze meccaniche, stimoli neuronali, componenti della matrice extracellulare, citochine solubili e fattori di crescita che influenzano l'espressione di specifici geni. Il fenotipo di una SMC può essere distinto mediante specifici *marker* genici che codificano per proteine necessarie per la funzione contrattile o sintetica.

Il fenotipo contrattile è caratterizzato da un aumento delle proteine del citoscheletro o coinvolte nella contrazione, tra cui la *smooth muscle* (SM)  $\alpha$ -actin, la SM basic (*h1*) calponin, le SM myosin heavy chains (SM MHCs), le SM myosin light chains, la SM  $\alpha$ -tropomyosin, la transgelin (SM22 $\alpha$ ), la caldesmon, la  $\beta$ -vinculin, la metavinculin, la telokin, la smoothelin, il lipoma-

*preferred partner* (LPP) e la *desmin* [10, 23].

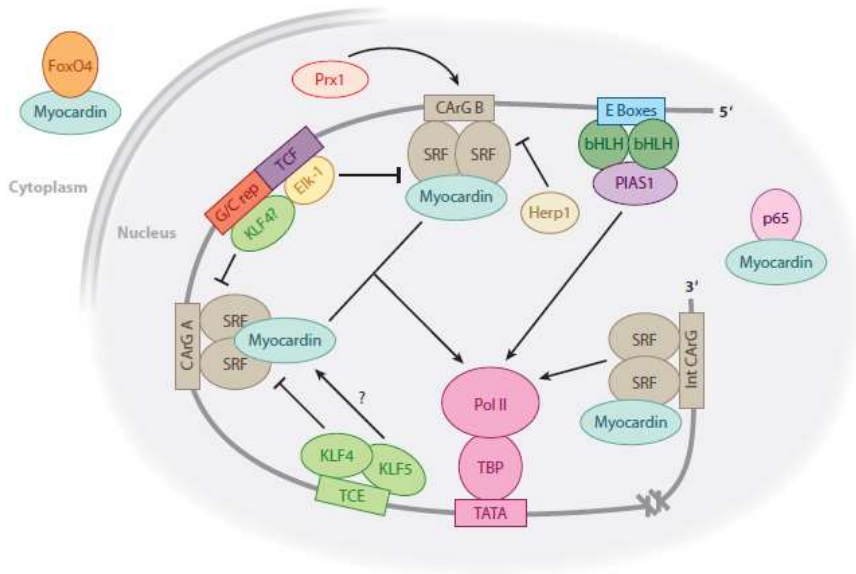
In particolari condizioni questi *marker* possono essere espressi anche in non-SMC, ad eccezione delle isoforme delle miosine a catena pesante (SM MHC), che risultano più specifiche. Perciò per comprendere il fenotipo in cui si trova la cellula è necessario esaminare l'espressione di più marcatori contemporaneamente.

Identificare *marker* del fenotipo sintetico risulta più difficile, in quanto la loro espressione è meno specifica e deve essere interpretata in base all'origine delle cellule [12].

#### **4.2.1.21 meccanismi di regolazione del fenotipo delle cellule muscolari lisce**

Studi in animali transgenici hanno permesso di identificare regioni promotrici o introniche nei *marker* di differenziamento che inducono l'espressione selettiva di queste proteine nelle SMC. Questi sono elementi regolatori che determinano la trascrizione in risposta a segnali esterni. L'espressione genica non dipende però da un singolo fattore, ma è dovuta all'interazione di stimoli ubiquitari e/o specifici per questo tipo di cellule.

La trascrizione della maggior parte dei *marker* delle SMC è associata alla presenza di CArG *elements* (ripetizioni della sequenza CC(AT)<sub>6</sub>GG) all'interno del loro promotore o di regioni introniche [23-29]. A queste sequenze si lega il *serum response factor* (SRF), un fattore di trascrizione che promuove il reclutamento dell'RNA polimerasi II (figura 4). Una proteina, la miocardina, espressa solamente nel tessuto cardiaco e nel tessuto muscolare liscio, funge da coattivatore. Essa interagisce con SRF inducendo l'espressione di geni specifici per la differenziazione delle SMC [30].



**Figura 4: Meccanismo molecolare alla base della regolazione dell'espressione genica dei marker di differenziamento delle SMC.**

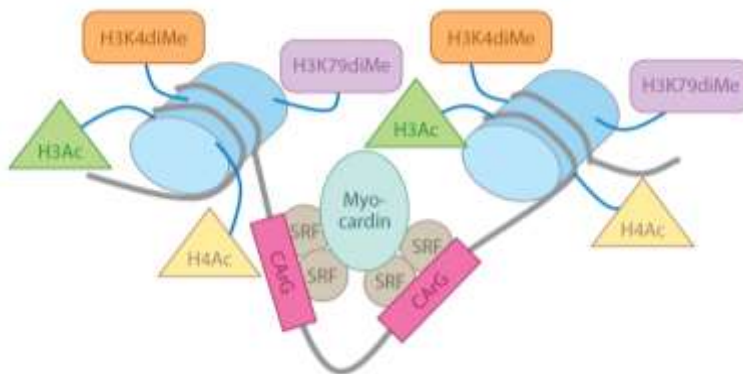
La regolazione dell'espressione di geni specifici delle SMC è dovuta all'interazione tra regioni geniche conservate (CARG *elements*) e fattori di trascrizione. La miocardina promuove l'interazione tra il *serum response factor* e i CARG *elements* di geni che codificano per proteine contrattili o citoscheletriche, determinando il reclutamento dell'RNA Pol II. Immagine modificata dal lavoro di Alexander e al. 2011 [23].

Il legame del complesso SRF-miocardina ai CARG *elements* è controllato dalla struttura della cromatina e da meccanismi epigenetici. La cromatina è composta da DNA e proteine e la sua conformazione è regolata sia da meccanismi epigenetici (metilazione del DNA, modificazioni degli istoni) che dall'azione di proteine che legano il DNA (tra cui fattori di trascrizione e repressori) [23, 31]. L'unità fondamentale della cromatina è il nucleosoma, composto da 146 bp di DNA avvolte intorno ad un complesso di otto proteine istoniche (due copie per ogni istone H2A, H2B, H3 e H4). Ogni particella nucleosomica è separata dalla successiva da un tratto di

connessione che è composto da DNA e dall'istone H1.

Le code degli istoni, che sono esposte all'ambiente nucleare, sono soggette a differenti modificazioni come acetilazioni, fosforilazioni, metilazioni, ubiquitinazioni e ADP ribosilazioni. Queste modificazioni, in particolare l'acetilazione, la fosforilazione e la metilazione degli istoni H3 e H4 regolano il legame di specifici fattori di trascrizione al DNA, alterando la conformazione della cromatina [23, 31].

Durante la differenziazione delle SMC, le code degli istoni associate ai promotori dei *marker* di uno specifico fenotipo, vengono modificate mediante acetilazioni degli istoni H3 e H4 (H3Ac e H4Ac) e dimetilazioni delle lisine 4 e 79 dell'istone H3 (H3K4diMe e H3K79diMe) [23, 32, 33]. Queste modificazioni determinano l'apertura della cromatina di questi promotori, permettendo il legame del complesso SRF-miocardina ai CArG *elements* (figura 5).



**Figura 5: Regolazione epigenetica dell'espressione genica nelle SMC.**

Durante la differenziazione delle SMC le code degli istoni dei marker fenotipici subiscono modificazioni post-traduzionali come le acetilazioni degli istoni H3 e H4 (H3Ac e H4Ac) e le dimetilazioni delle lisine 4 e 79 dell'istone H3 (H3K4diMe e H3K79diMe). Queste modificazioni permettono il legame del complesso SRF-miocardina ai CArG *elements*. Immagine modificata dal lavoro di Alexander e al. 2011 [23].

Quando si verifica un danno vascolare, la perdita delle acetilazioni sugli istoni H3 e H4 e dell'H3K79 dimetilazione riduce l'accessibilità del complesso SRF-miocardina alle regioni promotrici dei marker del fenotipo contrattile, impedendone l'espressione [23, 33-35]. La repressione della trascrizione dipende principalmente dal fattore di trascrizione KLF4, il quale (1) non è normalmente espresso nei vasi sanguigni ma aumenta in seguito ad una lesione vascolare [23, 36]; (2) quando viene over-espresso porta ad una riduzione della trascrizione dei geni controllati dal complesso SRF-miocardina [23, 36]; (3) determina cambiamenti epigenetici che portano ad un silenziamento trascrizionale, mediante reclutamento di deacetilasi (HDAC 2 e 5) che agiscono sull'istone H4 impedendo il legame tra SRF e le sequenze del DNA [23, 33, 35].

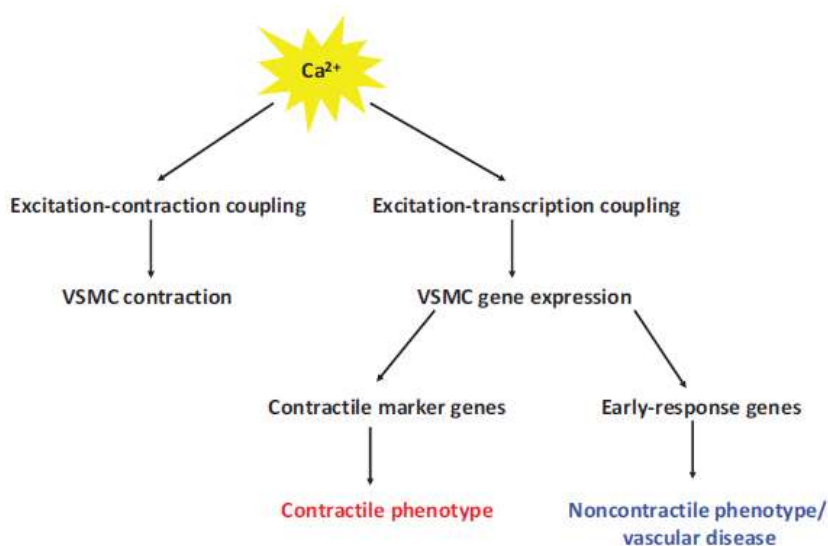
Un meccanismo di *feedback* positivo è attivo nelle SMC contrattili per controllare i livelli di KLF4 e impedire lo *switch* fenotipico: il complesso miocardina-SRF attiva due microRNA (miR-145 e miR-143) deputati alla degradazione KLF4 [23, 37, 38], regolandone così i livelli cellulari.

Anche la reversibilità della trasformazione fenotipica delle SMC potrebbe essere mediata da un controllo epigenetico. Il silenziamento dei geni specifici del fenotipo contrattile, dovuto all'attivazione di KLF4, è associato alla perdita del legame del complesso SRF-miocardina, alla formazione di eterocromatina e alla deacetilazione degli istoni H3 e H4. Durante questo processo la dimetilazione dell'istone H3 (H3K4diMe) persiste. Questa modificazione potrebbe costituire un meccanismo epigenetico di memoria cellulare che permette la redifferenziazione delle SMC dal fenotipo sintetico a quello contrattile [23].

#### **4.2.1.3 I meccanismi di contrazione delle cellule muscolari lisce**

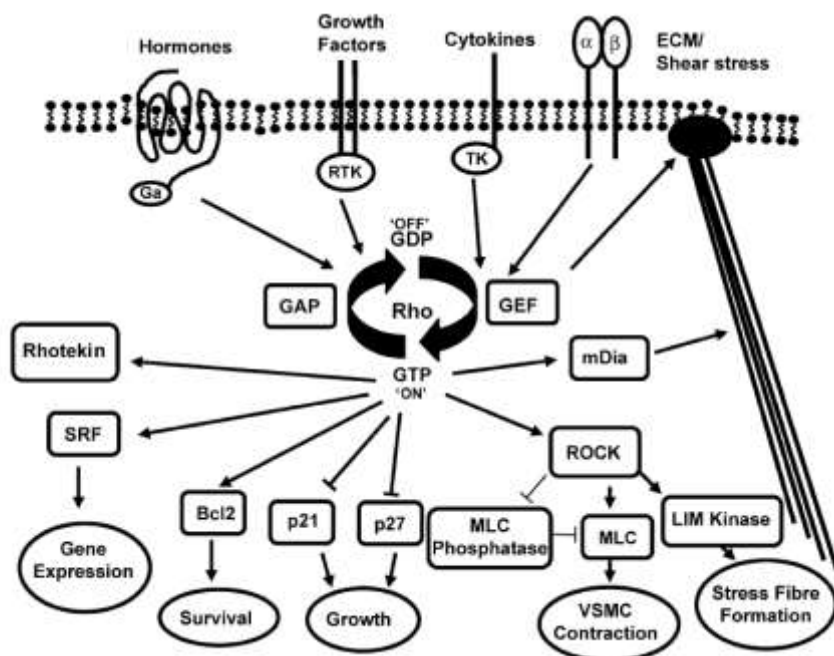
La contrazione delle SMC vascolari è controllata dalla concentrazione citoplasmatica di  $\text{Ca}^{2+}$  e dal *signaling* delle Rho chinasi. Nel primo caso, le

oscillazioni citoplasmatiche dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  ne determinano il rilascio dal reticolo endoplasmatico, causando la depolarizzazione della membrana citoplasmatica per amplificare e mantenere il segnale [39]. Nel secondo, i componenti del siero come i fosfolipidi, le citochine, i fattori di crescita, o le molecole di adesione e lo stress meccanico attivano la cascata di segnale intracellulare delle Rho chinasi [40]. Entrambe le vie portano alla fosforilazione della catena leggera della miosina che favorisce il legame dell'actina alla miosina permettendo lo scorrimento dei filamenti e conseguentemente la contrazione della cellula [41]. Sia il *signaling* del  $\text{Ca}^{2+}$  che quello delle Rho chinasi regolano anche altri *pathway* intracellulari, tra cui quelli che portano all'espressione dei geni del fenotipo contrattile delle SMC [40, 42] (figura 6, figura 7).



**Figura 6: Schema delle risposte cellulari attivate nelle SMC in risposta ad un incremento di  $\text{Ca}^{2+}$ .**

L'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  nelle SMC determina lo scorrimento dei filamenti di actina e miosina consentendo la contrazione cellulare e attiva la trascrizione di specifici geni, tra cui i *marker* del fenotipo contrattile. Immagine modificata dal lavoro di Kudryavtseva e al. 2013 [42].

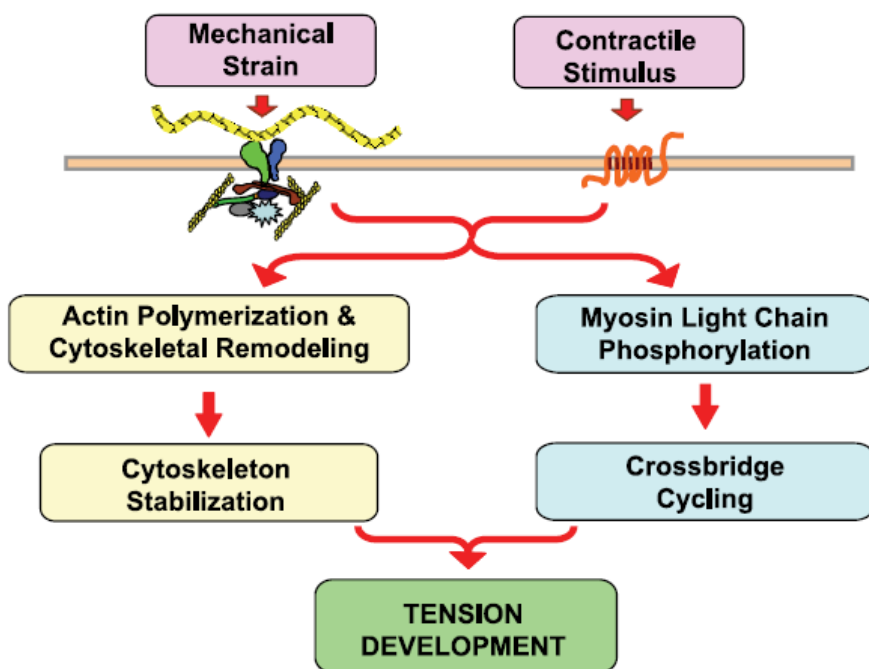


**Figura 7: Schema delle risposte cellulari attivate nelle SMC dal *signaling* delle Rho chinasi.**

Le proteine Rho sono attivate da componenti del siero, da molecole di adesione o dallo stress meccanico. Queste proteine regolano diverse funzioni cellulari tra cui la formazione di filamenti actinici e di adesioni focali, la contrazione, la crescita, la sopravvivenza cellulare e l'espressione genica. Tra le proteine effettrici troviamo infatti la fosfatasi della catena leggera delle miosine ed il fattore di trascrizione SRF. Immagine modificata dal lavoro di Rolfe e al. 2005 [40].

Recenti studi hanno dimostrato l'importanza di un altro meccanismo nella contrazione delle SMC: la polimerizzazione dell'actina e il rimodellamento del citoscheletro, un processo indipendente dai cambiamenti intracellulari di  $\text{Ca}^{2+}$  e dalla fosforilazione della catena leggera della miosina [43-46] (figura 8).

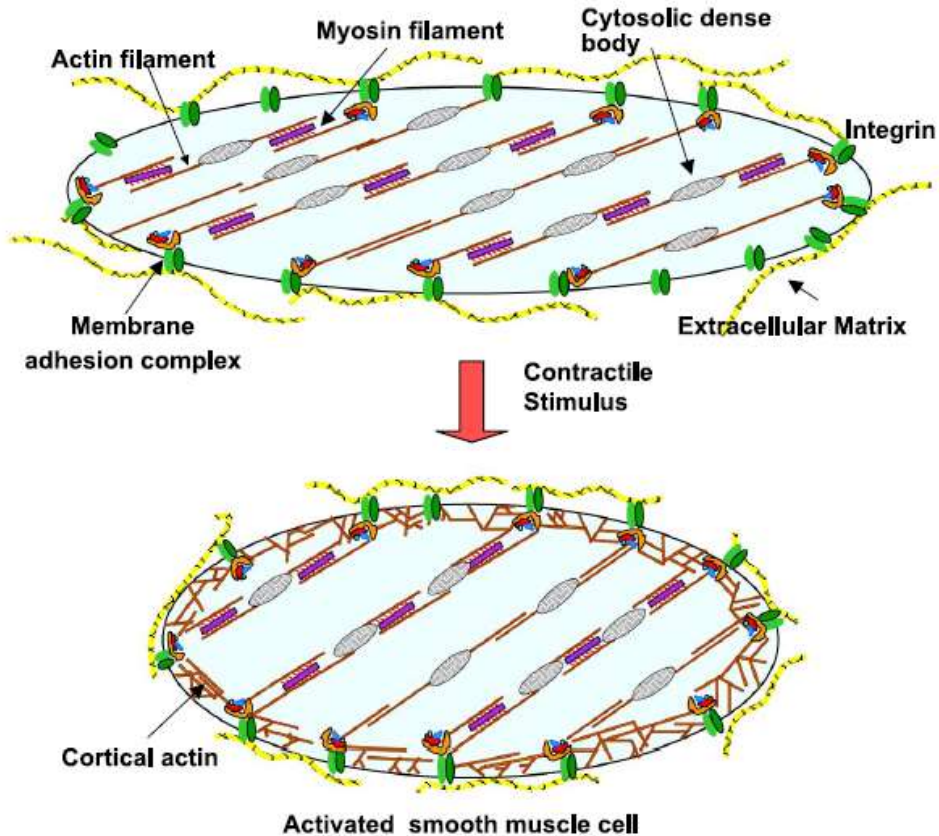




**Figura 8: Meccanismi che attivano la contrazione cellulare delle SMC.**

Nelle SMC vascolari la contrazione cellulare avviene attraverso due meccanismi indipendenti: la fosforilazione della catena leggera della miosina che porta allo scorrimento dei filamenti di actina e miosina e la polimerizzazione dell'actina accoppiata al rimodellamento del citoscheletro. Immagine modificata dal lavoro di Gunst e al. 2008 [43].

In questo secondo meccanismo stimoli meccanici extracellulari regolano l'assemblaggio di proteine citoscheletriche in corrispondenza delle giunzioni di adesione con la matrice extracellulare (ECM, *extracellular matrix*) presenti sulla membrana citoplasmatica. In questi punti si viene a formare un complesso di adesione che catalizza la polimerizzazione di filamenti di actina in prossimità della corteccia cellulare e determina la riorganizzazione delle connessioni tra questi nuovi filamenti e la membrana. La formazione di questa rigida struttura corticale favorisce la trasmissione della forza di contrazione in tutto il tessuto (figura 9).

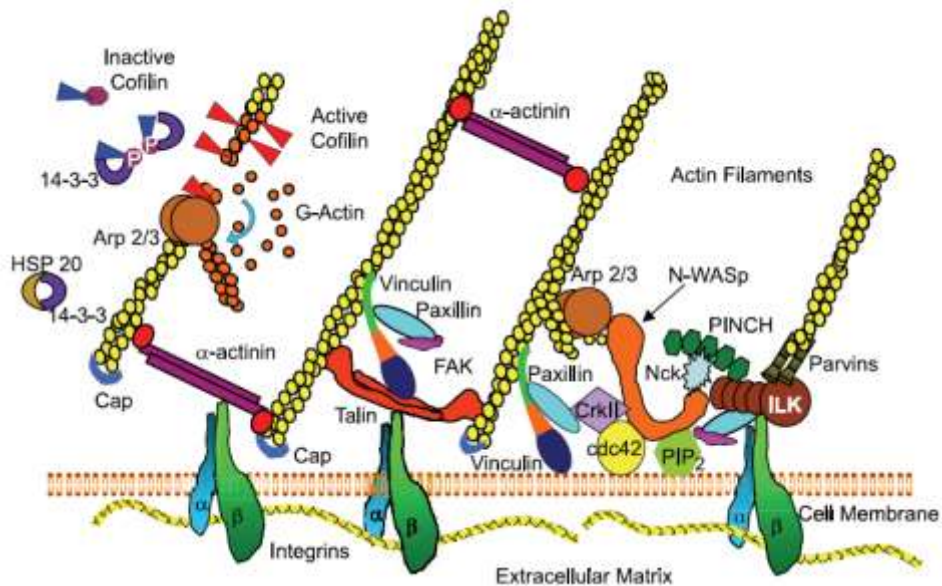


**Figura 9: Meccanismo di contrazione cellulare delle SMC basato sul rimodellamento del citoscheletro.**

Immagine modificata dal lavoro di Gunst e al. 2008 [43].

Nelle SMC vascolari, un incremento della pressione sulla parete delle arterie provoca una risposta miogena caratterizzata da un aumento della forza prodotta dalle SMC e un decremento del diametro vascolare [45, 46]. Durante questo processo le SMC sono soggette allo stress meccanico esterno che deforma l'ECM in cui sono incorporate; la tensione così generata viene trasmessa all'interno della cellula mediante la clusterizzazione delle integrine, un gruppo di proteine transmembrana, e il reclutamento di proteine in prossimità delle giunzioni di adesione [44]. Tra

queste la paxillina porta all'attivazione del complesso Arp2/3, che promuove la polimerizzazione dei filamenti di actina, mentre l'actinina, la filamina e la vinculina connettono e supportano i nuovi filamenti actinici alle integrine [43] (figura 10). Il processo di polimerizzazione è regolato dall'azione delle Rho chinasi e dalla cofilina.



**Figura 10: Organizzazione molecolare delle giunzioni di adesione nelle SMC in seguito ad uno stimolo esterno.**

I filamenti di actina sono legati alle code citoplasmatiche delle integrine mediante proteine di legame. Altre proteine regolano l'assemblaggio di questa struttura in prossimità delle giunzioni di adesione in risposta ad uno stimolo contrattile. Immagine modificata dal lavoro di Gunst e al. 2008 [43].

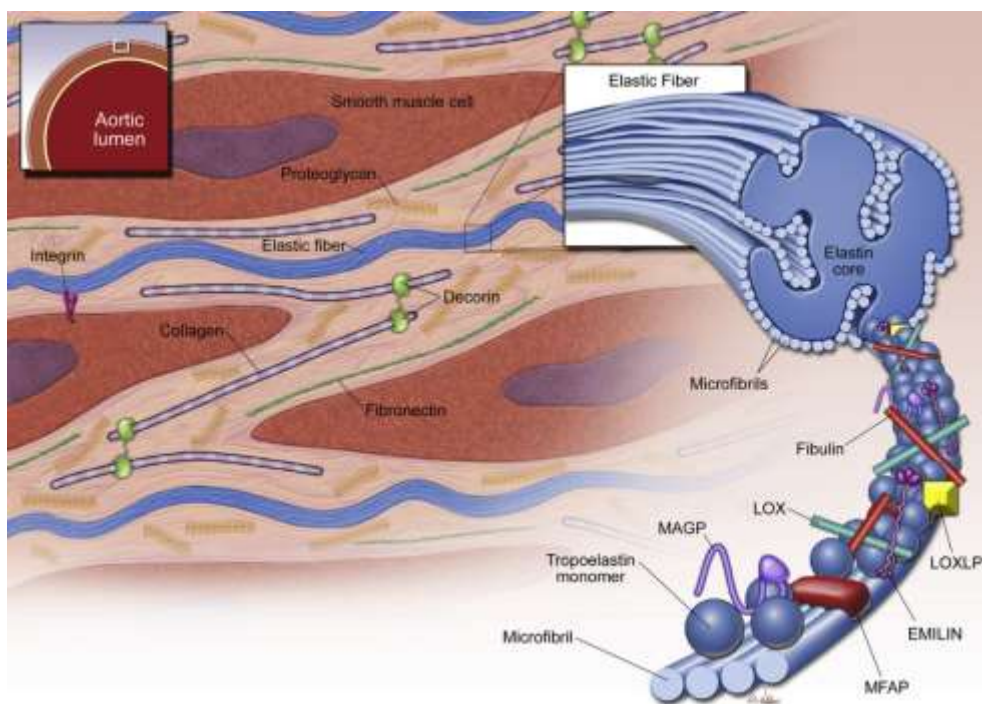
#### 4.2.2 La matrice extracellulare

I meccanismi di contrazione delle SMC e recenti studi su animali transgenici hanno evidenziato l'importanza di una terza componente dei vasi sanguigni nella patogenesi dell'ipertensione: la matrice extracellulare

[47].

L'ECM dei vasi è costituita da proteine fibrose associate a glicoproteine, incorporate in una struttura di glicosaminoglicani e proteoglicani. Queste molecole, in contatto con le cellule vascolari che le producono, sono organizzate in un network che conferisce alle arterie supporto meccanico ed elasticità [48]. L'elasticità è la proprietà dei vasi di contrastare le variazioni di pressione arteriosa durante il ciclo cardiaco, favorendo un flusso di sangue costante e una corretta perfusione degli organi. Questa caratteristica è conferita da fibre elastiche di diverso tipo disposte in strati concentrici all'interno della parete del vaso. A livello della tonaca intima, le cellule endoteliali secernono collagene VI e laminina, che costituiscono la lamina basale. Nella tonaca intermedia le SMC sono incorporate in strati di ECM, chiamati lamelle elastiche, composti principalmente da elastina. Esternamente, nella tonaca avventizia, i miofibroblasti si trovano in un'area ricca di collagene I e III che previene la rottura in caso di elevate pressioni arteriose. La quantità di collagene presente in questa zona influenza infatti la resistenza alla trazione dell'arteria [49].

Le lamelle elastiche della tonaca intermedia sono costituite da un *core* contenente elastina che si inserisce su uno *scaffold* di microfibrille. Queste ultime sono composte da diverse glicoproteine, come la fibrillina-1 e 2, le glicoproteine associate alle microfibrille (MAGP1 e MAGP2) e la proteina che lega il TGF- $\beta$  latente. Le microfibrille inoltre interagiscono con i proteoglicani e altre proteine localizzate sull'interfaccia elastina-miofibrille e superficie cellulare-fibre elastiche, chiamate Emiline e Fibuline (figura 11). Difetti genetici in queste componenti sono accompagnati da una struttura vasale alterata e polimorfismi in queste regioni del DNA sono stati associati all'insorgenza di ipertensione essenziale [47, 50-52].



**Figura 11: Componenti strutturali della tonaca intermedia dell'aorta.**

La tonaca media dell'aorta è costituita da SMC ed ECM. Quest'ultima è composta da fibre elastiche (lamelle), collagene e proteoglicani. Le lamelle elastiche sono costituite da elastina e microfibrille. Le microfibrille sono composte da diverse glicoproteine ed interagiscono con i proteoglicani e altre proteine chiamate Emiline e Fibuline. Immagine modificata dal lavoro di Wu e al. 2013 [53].

#### **4.2.2.1 Le alterazioni della struttura vasale**

L'aumento della resistenza arteriolare è correlato ad un generale restringimento dei vasi. Questo può essere dovuto ad un'alterata funzionalità, ad un decremento della distensibilità o ad una modificazione della struttura vascolare.

In ipertensione sono state riscontrate alterazioni strutturali e meccaniche dei vasi, associate a modificazioni delle SMC e dell'ECM. La suscettibilità delle SMC a cambiamenti ambientali influisce infatti sulla loro crescita

cellulare e sulla quantità di ECM deposta. A seconda del fenotipo, contrattile o sintetico, in cui si trovano queste cellule vengono secrete proteine differenti e la composizione della matrice varia [23].

Variazioni nella composizione o nella disposizione spaziale di queste molecole compromettono la funzionalità del vaso, causandone un rimodellamento. Le alterazioni meccaniche delle arterie dipendono infatti non solo dalla quantità dei loro costituenti, ma anche dall'organizzazione spaziale, dalla distribuzione relativa e dalle loro interazioni. L'elastogenesi, il processo che porta alla formazione delle fibre elastiche, avviene unicamente nel periodo neonatale; dopo questo periodo la deposizione di nuove fibre, in seguito a stimoli esterni, porta alla formazione di anomalie strutturali.

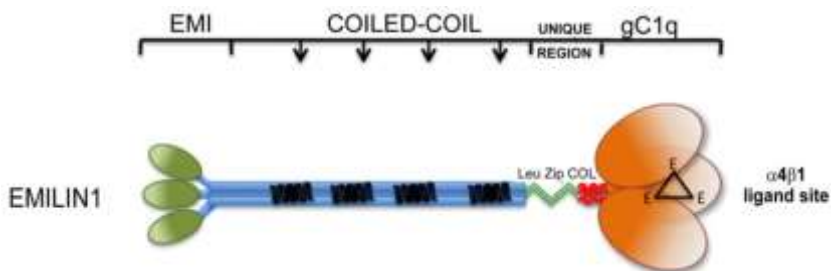
In alcuni stati patologici sono stati individuati difetti genetici nelle componenti dell'ECM, accompagnati da una struttura vasale alterata. In ipertensione il restringimento dei vasi è associato ad alterazioni delle proteine dell'ECM [50], tra cui:

- il collagene, una proteina che limita la distensione dei vasi, il cui aumentato deposito determina un incremento della rigidità della parete;
- le glicoproteine e le integrine, molecole adesive che mediano l'ancoraggio delle SMC all'ECM. Alterazioni in queste componenti modificano la struttura vascolare aumentando i legami cellula-ECM;
- i proteoglicani, come il *chondroitin sulfate*, l'*heparan sulfate*, il *biglycan* e la *decorin*, molecole che contribuiscono alla resistenza alla compressione dei vasi e fungono da siti di legame per citochine e fattori di crescita. Il loro aumento favorisce il rimodellamento vascolare;
- l'elastina, le cui alterazioni sono associate ad un numero anomalo di lamelle elastiche;

- le fibuline, proteine associate alle fibre elastiche e alla membrana basale, la cui mancanza determina alterazioni nelle lamelle elastiche con una riduzione dell'elasticità della parete del vaso;
- l'Emilina-1, la cui assenza provoca la perdita delle connessioni tra le lamelle elastiche e le cellule vascolari.

### 4.3 Emilina-1

L'Emilina-1 è una glicoproteina secreta associata alle fibre elastiche e alla miofibrille dei vasi sanguigni. Essa appartiene alla famiglia delle Emiline/Multimerine, caratterizzate dalla presenza di un dominio EMI nella propria sequenza. Questa famiglia comprende quattro proteine (Emilina-1, Emilina-2, Multimerina-1 e Multimerina-2) composte da un dominio EMI N-terminale ricco di cisteine, una regione centrale di circa 700 aminoacidi con un'elevata probabilità di formare  $\alpha$ -eliche, una regione unica per ogni membro e una regione omologa al dominio gC1q; la regione unica di Emilina-1 è costituita da una cerniera di leucine seguita da una sequenza *collagen-like* [54] (figura 12).



**Figura 12: Struttura di Emilina-1.**

Immagine modificata dal lavoro di Colombatti e al. 2011 [54].

All'interno delle cellule Emilina-1 è presente come un monomero, ma in seguito alla sua secrezione trimerizza grazie alla formazione di ponti

disolfuro e all'interazione dei tre domini C-terminali gC1q che stabilizzano la sua struttura quaternaria [55].

Questa proteina viene espressa dall'endocardio, dai miociti del ventricolo destro e dalle cellule della parete dei vasi sanguigni (EC, SMC e fibroblasti). Nell'ECM lega l'elastina e la fibulina-5, localizzandosi tra il *core* di elastina e lo *scaffold* di miofibrille delle lamelle elastiche. Risulta quindi importante per il mantenimento dell'ultrastruttura delle arterie, in quanto stabilizza le fibre elastiche mediante interazioni molecolari e influenza il legame delle cellule a queste ultime [56].

#### **4.3.1 Effetti delle carenze di Emilina-1 sulla pressione arteriosa**

L'Emilina-1 è implicata nell'elastogenesi e nel mantenimento della morfologia delle cellule vascolari. Animali deficitari di Emilina-1 presentano elevati livelli di pressione arteriosa, indipendenti dai valori di gittata cardiaca, accompagnati da un diametro arteriolare ridotto [8].

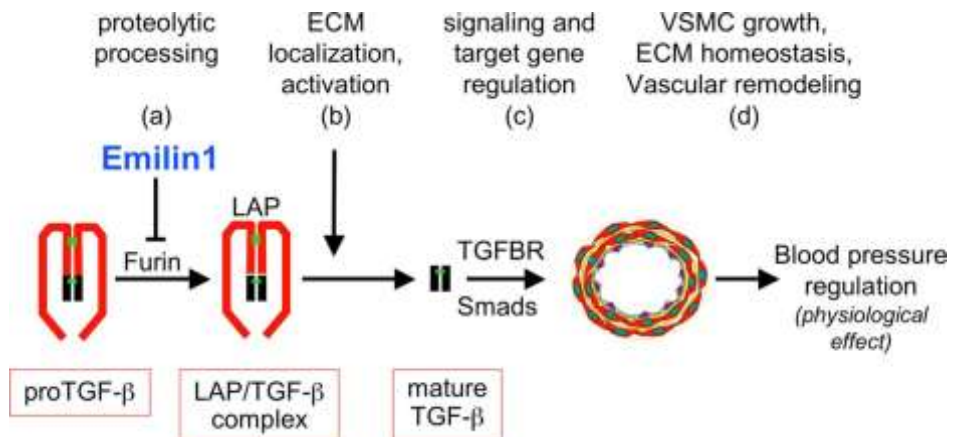
Studi su cellule derivate da questo modello hanno dimostrato che il meccanismo che controlla il restringimento del diametro vasale è mediato dal dominio EMI della proteina. A livelli fisiologici l'Emilina-1 inibisce l'attività di TGF- $\beta$ , un fattore di crescita che regola il tono miogenico dei vasi arteriosi, attraverso l'interazione tra il dominio EMI e il proTGF- $\beta$  [57].

Il TGF- $\beta$  viene sintetizzato come una proteina inattiva omodimerica, il proTGF- $\beta$ , contenente un propeptide (LAP, *latency-associated protein*). Il proTGF- $\beta$  viene secreto e processato dalla furina, un'endopeptidasi, nello spazio extracellulare [58]. Una volta clivato, il propeptide rimane legato non covalentemente al TGF- $\beta$  in un complesso latente che si lega alle molecole dell'ECM. Questa associazione previene l'interazione tra il TGF- $\beta$  e i suoi recettori finché LAP non viene rimosso. L'attivazione del TGF- $\beta$  è mediata dall'azione della trombospondina-1, delle integrine e di altre proteine.

Emilina-1 previene il processamento del proTGF- $\beta$  nella sua forma matura,



legandosi attivamente ad esso nello spazio extracellulare: essa interagisce specificamente con il proTGF- $\beta$  impedendo l'azione della furina e bloccando il taglio del propeptide LAP (figura 13).



**Figura 13: Meccanismo di inibizione del processamento di TGF- $\beta$  da parte di Emilina-1 nella parete vascolare.**

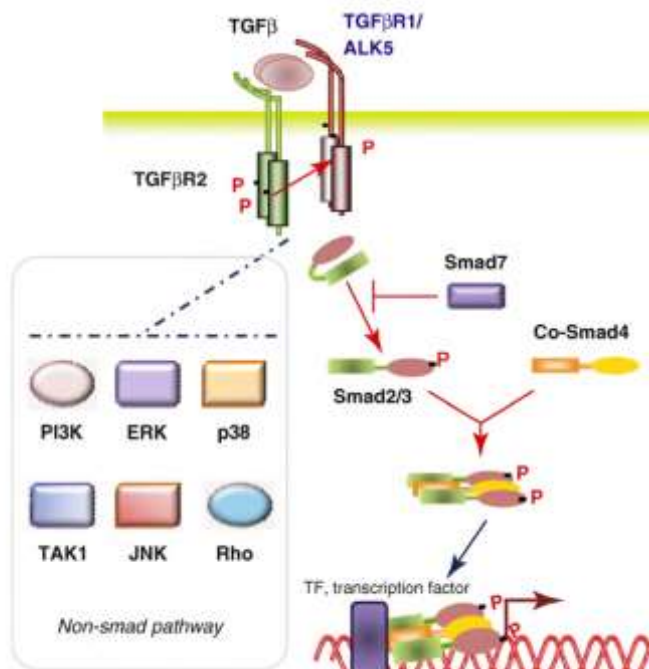
Il proTGF- $\beta$  viene secreto nella matrice extracellulare dove viene clivato dalla furina e attivato. L'Emilina-1 lega il proTGF- $\beta$  prevenendo il suo processamento. Immagine modificata dal lavoro di Zacchigna e al. 2006 [58].

In carenza di Emilina1, la furina cliva il propeptide aumentando la disponibilità di TGF- $\beta$  circolante che porta ad un'ipertensione sistemica accompagnata da un restringimento dei vasi e alterazioni strutturali nella parete elastica delle arterie [58].

#### 4.3.1.1 TGF- $\beta$

TGF- $\beta$  è un fattore di crescita che regola la sintesi dell'ECM, la progressione del ciclo cellulare, l'apoptosi, la differenziazione e la migrazione delle cellule. Fa parte di una famiglia di citochine con effetti pleiotropici ed è presente in tre isoforme (TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3). Nella sua forma attiva lega due recettori serina/treonina chinasi specifici: TGF- $\beta$  RI

(ALK, *activin receptor-like kinase*) e TGF- $\beta$  RII. Il legame induce la formazione di un complesso eterotetramerico dei recettori, dove TGF- $\beta$  RII transfosforila e attiva TGF- $\beta$  RI il quale trasduce il segnale fosforilando due serine C-terminali dei fattori di trascrizione R-SMAD. Questi fattori si dividono in due gruppi: il primo comprende Smad1, 5 e 8, il secondo è costituito da Smad2 e 3. Il legame di TGF- $\beta$  ad ALK attiva prevalentemente i recettori Smad2 e 3 i quali formano un complesso con Smad4 e traslocano nel nucleo dove controllano la trascrizione di differenti geni *target* [59-61] (figura 14).



**Figura 14: Meccanismo di trasduzione del segnale attivato da TGF- $\beta$ .**

Immagine modificata dal lavoro di Pardali e al. 2010 [62].

TGF- $\beta$  agisce anche tramite l'attivazione di altre vie di segnale, come le MAP chinasi, il *signaling* delle Rho GTPasi ed il *pathway* PI3K/AKT [61].

#### **4.3.1.2 Gli effetti di TGF- $\beta$ 1 sui vasi sanguigni**

TGF- $\beta$ 1 è espresso dalle EC e dalle SMC e svolge un ruolo importante nello sviluppo dei vasi sanguigni, sia in condizioni fisiologiche che patologiche. In particolare in ipertensione determina un aumento della resistenza periferica mediante un incremento delle molecole vasoattive e un rimodellamento dell'architettura dei vasi sanguigni [63].

TGF- $\beta$ 1 inibisce la produzione di ossido nitrico e stimola l'espressione di endotelina-1, un potente vasocostrittore secreto dalle EC. Nelle SMC invece blocca la proliferazione cellulare e induce l'espressione di *marker* del fenotipo contrattile: il *pathway* TGF- $\beta$ /Smad3 attiva il complesso SRF-miocardina [60, 64]. TGF- $\beta$ 1 promuove inoltre la deposizione di ECM nei vasi sanguigni [63].

Nei topi knockout per il gene Emilina-1 un aumento di TGF- $\beta$ , nonostante i suoi effetti pleiotropici, non determina un fenotipo severo. La presenza di altre Emiline, che svolgono funzioni simili ad Emilina-1, e di meccanismi regolatori multipli che controllano il *pathway* di TGF- $\beta$  potrebbero infatti limitarne gli effetti [8]. La capacità di Emilina-1 di regolare il *signaling* del TGF- $\beta$  evidenzia comunque la possibilità dell'ECM di partecipare attivamente alla regolazione di fattori di crescita nell'insorgenza di patologie vascolari.

#### **4.4 La proteomica in ipertensione**

La predisposizione genetica, le alterazioni del sistema simpatico, l'ipertrofia vascolare, il rimodellamento della struttura dei vasi, le anomalie nel trasporto degli ioni e nel bilanciamento del sodio, le disregolazioni del sistema renina-angiotensina, gli effetti dell'ossido nitrico e dell'endotelina, l'insulino-resistenza e le disfunzioni delle EC e SMC, sono tra i potenziali meccanismi alla base dell'ipertensione essenziale. Tra questi i fattori genetici sembrano essere tra le principali cause della patologia. Le

interazioni tra geni e tra i geni e l'ambiente ne determinano infatti il suo sviluppo [65].

In patologie multifattoriali, come l'ipertensione, è necessario identificare più *marker* contemporaneamente per diagnosticarle, definirne la gravità e la prognosi. Studi genetici hanno permesso di individuare diversi geni implicati nella patologia, ma lo studio dei loro prodotti, le proteine, può contribuire a comprendere la connessione tra i fattori genetici e ambientali e chiarire i meccanismi che intervengono a livello cellulare. Un approccio di tipo proteomico inoltre permette la generazione di ipotesi, che possono aprire nuove strade per l'identificazione di potenziali biomarcatori o nuovi *target* terapeutici [66].

#### **4.4.1 La proteomica**

Il genoma umano contiene circa 20000 geni; ogni gene, in seguito a *splicing* alternativi e modificazioni post-trascrizionali, può codificare per circa 10 proteine [66]. Se la genomica spiega qual è la predisposizione genetica per una malattia, la proteomica fornisce un quadro dei processi attivi nelle cellule al momento dello studio. Essa infatti permette di indagare i cambiamenti dell'espressione proteica totale di un tessuto in seguito alla presenza/assenza di una proteina, mostrando come questa influenzi l'equilibrio fisiologico del tessuto, favorendo, inoltre, l'individuazione di vie di segnale alterate.

L'obiettivo di questa branca della scienza è quello di comprendere meglio i meccanismi cellulari che variano nel corso di uno stato fisiologico o patologico per indagare e stabilire l'identità, la quantità, la struttura e le funzioni biochimiche e cellulari di tutte le proteine in un organismo, organo od organello.

I moderni studi sul proteoma possono essere divisi essenzialmente in due sottotipi, il proteoma d'espressione e il proteoma funzionale. Gli studi

d'espressione prevedono la quantizzazione delle proteine differenzialmente espresse e l'identificazione delle molecole coinvolte nei processi fisiologici e fisiopatologici. La proteomica funzionale si prefigge invece di caratterizzare la funzione delle proteine analizzandone le modificazioni, le interazioni e l'attività.

#### **4.4.2 Metodologie in proteomica**

Negli studi proteomici d'espressione è fondamentale poter usufruire di metodologie che permettono di quantizzare ed identificare le proteine presenti in un estratto cellulare. Spesso le molecole che svolgono un ruolo fondamentale nella cellula sono espresse in un ridotto numero di copie, per questo motivo sono state sviluppate metodologie e strumentazioni sempre più sensibili e precise che potessero permettere l'analisi di specie proteiche poco abbondanti.

Un classico approccio proteomico quantitativo prevede che le proteine vengano estratte da cellule, tessuti o fluidi corporei, prefrazionate e separate mediante tecniche basate su gel di poliacrilammide (*two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis*, 2D-PAGE) o *off-gel (high-performance liquid chromatography*, HPLC). I livelli di espressione proteica tra due campioni da confrontare vengono poi definiti mediante un'analisi basata sull'intensità delle spot proteiche o sul peso di reagenti isotopici e le proteine vengono identificate tramite spettrometria di massa. Un'analisi bioinformatica permette infine di ottenere ulteriori informazioni riguardo alle interazioni proteina-proteina e al ruolo fisio-patologico delle proteine identificate [65] (figura 15).

A livello metodologico, quindi, un ruolo chiave negli esperimenti di proteomica è svolto dalla spettrometria di massa che, accoppiata a tecniche separative quali l'elettroforesi bidimensionale e cromatografia in fase liquida, permette di identificare le proteine sfruttando una loro

proprietà intrinseca: il peso molecolare.

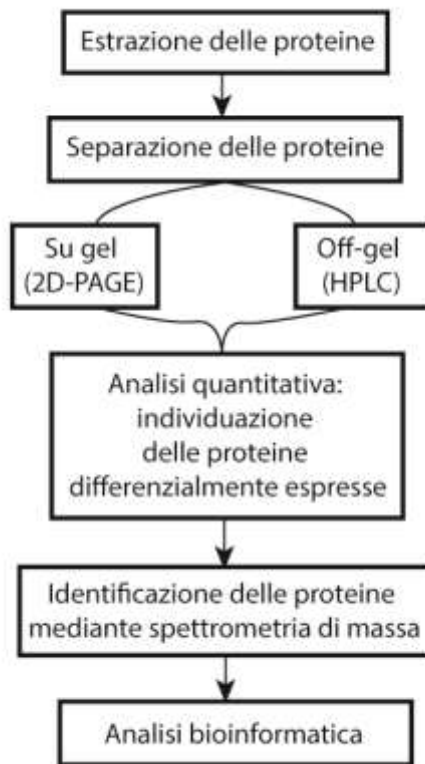


Figura 15: Schema di un classico approccio proteomico.

#### **4.4.2.1 L'elettroforesi bidimensionale**

L'elettroforesi bidimensionale è una tecnica che permette di separare simultaneamente su gel una miscela di proteine sfruttando due loro proprietà indipendenti: il punto isoelettrico e il peso molecolare.

Il primo passo è l'isoelettrofocalizzazione (IEF) mediante la quale le specie proteiche vengono separate in base al loro punto isoelettrico. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di

pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine migrano fino alla posizione del gradiente alla quale la loro carica netta è nulla.

Il secondo passo è una elettroforesi in condizioni denaturanti su gel di poliacrilammide. Prima di questa ulteriore separazione, però, le proteine presenti nel campione vengono trattate con una soluzione contenente sodio dodecil solfato (SDS). Questo è un detergente anionico in grado di stabilire interazioni non covalenti mediante la sua catena alifatica con lo scheletro peptidico delle proteine. Nelle condizioni sperimentali utilizzate, le proteine legano un numero di molecole di SDS approssimativamente proporzionale al loro peso molecolare: quindi, indipendentemente dalla loro dimensione, assumono lo stesso rapporto massa/carica ( $m/z$ ) e sono soggette, in un campo elettrico uniforme, alla stessa accelerazione. È possibile quindi sfruttare per la separazione le differenti proprietà idrodinamiche delle proteine, poiché la resistenza che esse incontrano nell'attraversare le maglie del gel di poliacrilammide dipende esclusivamente dalla loro dimensione. In questo caso la separazione delle specie proteiche presenti avviene in base al loro peso molecolare.

Questa tecnica separativa è particolarmente indicata per la separazione di proteine dai pesi molecolari compresi tra i 10 kDa e i 100 kDa e i punti isoelettrici compresi tra pH 3 e pH 9.

#### ***4.4.2.2 I limiti dell'elettroforesi bidimensionale***

L'elettroforesi bidimensionale seguita dalla spettrometria di massa è uno degli approcci più utilizzati per quantificare ed identificare le proteine di una miscela complessa. Ma, nonostante il suo alto potere di risoluzione, presenta alcune limitazioni, tra cui la scarsa risoluzione delle proteine idrofobiche e la perdita delle proteine ad alto e basso peso molecolare [67]. Questo limite deriva dal fatto che per l'IEF i valori di pH che possono essere presi in considerazione vanno da 3 a 11. Proteine che presentano

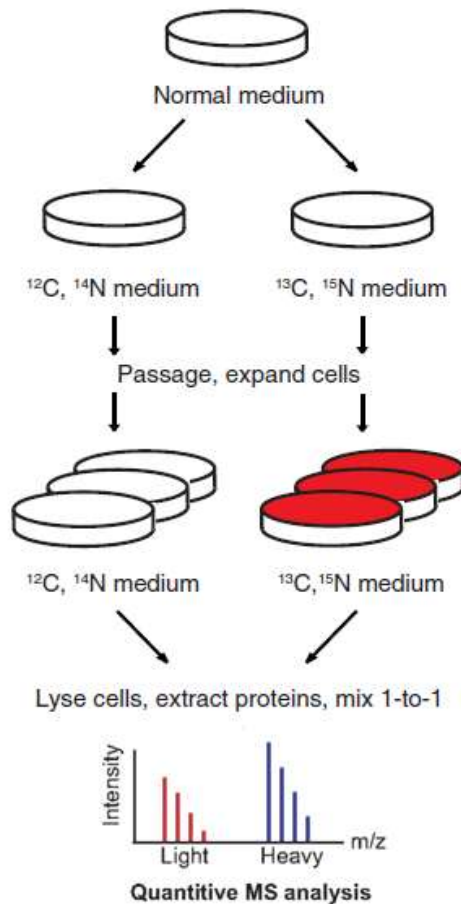
un punto isoelettrico minore di 3 o maggiore di 11 non verranno separate. Lo stesso problema lo si riscontra quando si sottopone il campione ad analisi elettroforetica. Non tutte le proteine, infatti, riescono ad attraversare le maglie del gel di poliacrilammide. Questa difficoltà può essere superata variando la percentuale di acrilammide: diminuendola si permette alle proteine con peso molecolare maggiore di entrare nelle maglie del gel e quindi di essere separate. L'idrofobicità delle proteine, come quelle di membrana, invece influenza la solubilità nei mezzi acquosi utilizzati nel passaggio di isoelettrofocalizzazione, perciò l'efficienza di analisi cambia da proteina a proteina.

Questi svantaggi sono stati superati grazie all'introduzione di tecniche *off-gel* che prevedono la marcatura chimica delle proteine con isotopi stabili, seguita da analisi quantitativa attraverso spettrometria di massa. Queste tecniche si basano sul legame di reagenti isotopicamente diversi ma chimicamente identici a proteine o peptidi di due campioni da confrontare. Gli isotopi utilizzati differiscono per la sostituzione di un atomo di idrogeno (H) con un atomo di deuterio ( $^2\text{D}$ ), che incrementa la massa molecolare di 1 Da, o per l'inserimento di atomi di  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$  [67]. Dopo la marcatura i campioni vengono combinati e analizzati usando una separazione con cromatografia in fase liquida seguita da spettrometria di massa. L'analisi quantitativa viene effettuata comparando i segnali dello spettro di massa relativi al peptide marcato con l'isotopo leggero con quelli del peptide marcato con l'isotopo pesante. Infine, i peptidi vengono identificati mediante MS/MS.

#### **4.4.2.3 Metodologie basate sul legame di isotopi stabili**

I reagenti isotopici sono stati inseriti in cellule vive mediante la tecnologia SILAC (*Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture*) (figura 16).





**Figura 16: Step di un esperimento SILAC.**

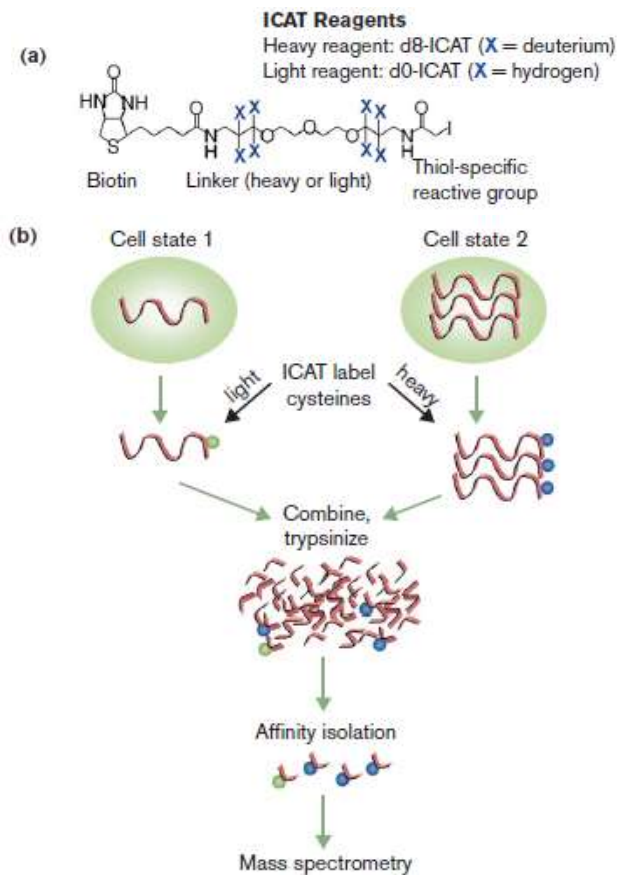
Le cellule vengono fatte crescere in un terreno con aminoacidi contenenti  $^{12}\text{C}$  e  $^{14}\text{N}$  (marcatura *light*) o con  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$  (marcatura *heavy*). Le cellule vengono poi unite, lisate e gli estratti proteici analizzati mediante spettrometria di massa. L'intensità dei picchi di uno stesso peptide varia a seconda nei due campioni in base al tipo di marcatura effettuata. Immagine modificata dal lavoro di Ong e al. 2012 [68].

Questa si basa sulla coltivazione di due popolazioni cellulari in terreni di coltura differenti. Il primo terreno è costituito da aminoacidi essenziali normali, il secondo da aminoacidi contenenti isotopi stabili, come arginine o

lisine che presentano  $^2\text{D}$ ,  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ . Le cellule che vengono fatte crescere nel secondo terreno incorporano gli aminoacidi modificati nelle loro proteine attraverso i processi naturali di *turnover proteico* e crescita cellulare. Perciò le due popolazioni cellulari alla fine presentano le stesse caratteristiche, ma le loro proteine possono essere distinte mediante spettrometria di massa sulla base della differenze di massa molecolare introdotte dagli aminoacidi modificati [68] (figura 16).

Un'ovvia limitazione a questo tipo di marcatura metabolica è che può essere effettuata solo in cellule vive, in cui si verificano una sintesi e un *turnover* delle proteine frequenti. Quantificare l'abbondanza proteica in tessuti e fluidi umani mediante SILAC non è possibile, in quanto in questo caso la marcatura deve essere effettuata a livello delle proteine intatte.

Una delle prime tecniche utilizzate a questo scopo è l'ICAT (*Isotope Coded Affinity Tagging*) [69], che consiste nel marcare, a livello delle cisteine ridotte, due estratti proteici da confrontare con due reagenti isotopici diversi. Si tratta di reagenti contenenti un gruppo iodoacetamidico, che reagisce con le cisteine libere, una coda di biotina utilizzata per la purificazione d'affinità dei peptidi marcati e una regione *linker* contenente i marcatori isotopici. Uno dei reagenti porta atomi d'idrogeno legati allo scheletro di carbonio, mentre nell'altro gli atomi di idrogeno sono sostituiti con atomi del suo isotopo pesante, il deuterio (figura 17); perciò i due campioni possono essere discriminati mediante spettrometria di massa grazie ad una differenza di 8 Da. Dopo la marcatura le due miscele proteiche vengono riunite e sottoposte a digestione enzimatica. I peptidi marcati possono essere selettivamente isolati attraverso una cromatografia di affinità basata sull'interazione avidina/biotina, permettendo una notevole riduzione della complessità del sistema, e analizzati mediante spettrometria di massa (figura 17).



**Figura 17: Step di un esperimento ICAT.**

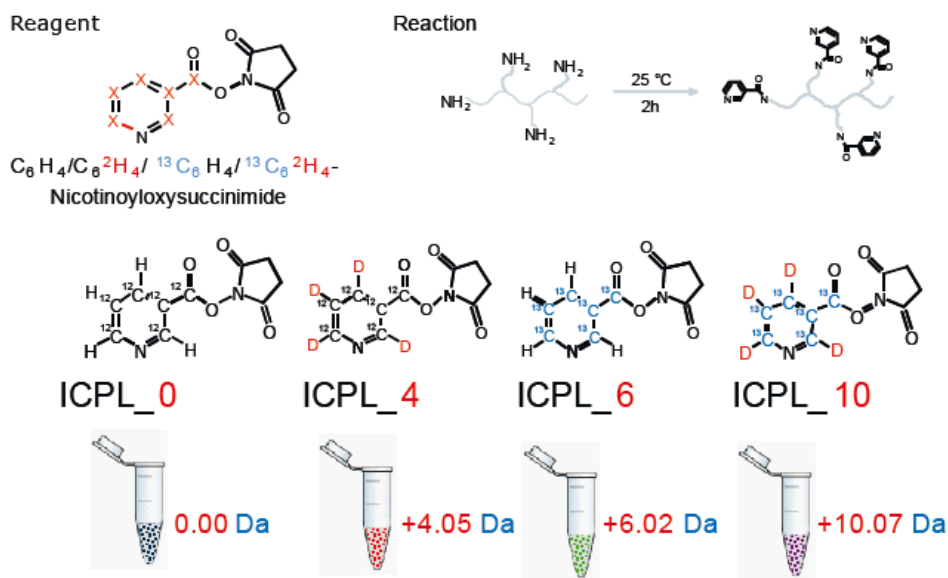
a) Struttura dei reagenti ICAT. b) Schema sperimentale dell'analisi delle proteine marcate con questa tecnologia. Immagine modificata dal lavoro di Gygi e al. 2000 [70].

Il principale svantaggio di questa strategia risiede nel fatto che solo le proteine contenenti cisteina vengono derivatizzate e marcate. Per superare questo problema è stata introdotta la tecnologia ICPL (*Isotope-Coded Protein Label*), disegnata per legare isotopi stabili a proteine intatte. Questa si basa sulla marcatura dei gruppi aminici liberi delle proteine mediante nicotinoyloxysuccinimide, una molecola che si lega ai residui N-terminali e agli  $\epsilon$ -aminogruppi delle lisine [67, 71].

Fino a quattro campioni proteici da confrontare possono essere solubilizzati

da cellule, tessuti o fluidi biologici con questa tecnologia. Le proteine di ogni campione vengono ridotte, alchilate e marcate con diversi reagenti isotopici. Questi differiscono in base alla presenza di atomi di idrogeno o deuterio e/o atomi di  $^{12}\text{C}$  o  $^{13}\text{C}$  (figura 18), che permettono ai campioni marcati di essere distinti tramite spettrometria di massa grazie ad una differenza di 4, 6 e 10 Da.

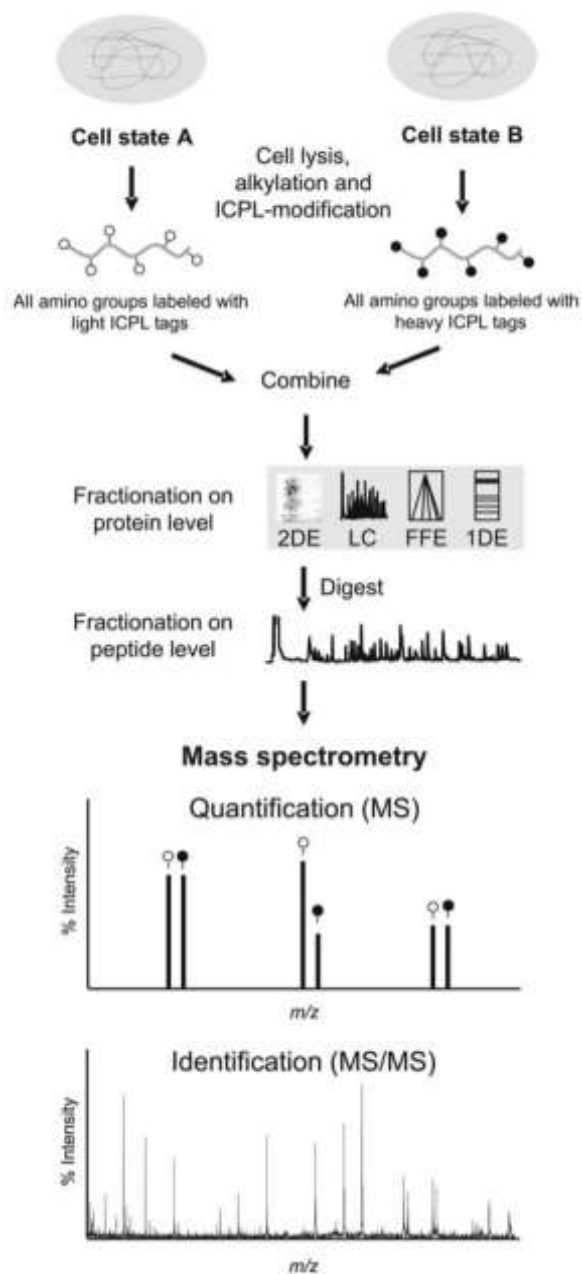
Dopo aver unito i quattro campioni proteici, un qualsiasi metodo di separazione può essere adottato per ridurre la complessità della miscela proteica. Le proteine vengono digerite e i peptidi analizzati mediante MS e MS/MS.



**Figura 18: Chimica dei reagenti ICPL.**

Struttura di base della nicotinoyloxysuccinimide e schema della reazione di marcatura, che permette il legame della molecola ai residui N-terminali e agli  $\epsilon$ -aminogruppi delle lisine. Sono presenti quattro varianti di questo reagente, in cui la sostituzione con 4 atomi di deuterio o sei atomi di  $^{13}\text{C}$  inducono un cambiamento della massa molecolare di 4,05, 6,02 e 10,07 Da alla forma base. Immagine modificata dall'Application Note MT-106, Bruker [72].

I peptidi derivati da due campioni differenti hanno sequenza identica ma massa molecolare diversa, perciò lo spettro di massa presenta picchi doppi che possono essere quantizzati. Il ratio tra questi picchi fornisce l'abbondanza relativa della proteina nei due campioni. Infine le proteine vengono identificate mediante *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) o *Collision Induced Dissociation* (CID) [67] (figura 19).



**Figura 19: Step di un esperimento ICPL.**

Immagine modificata dal lavoro di Kellermann al. 2008 [67].

## 5. SCOPO DEL LAVORO

L'obiettivo di questo lavoro è quello di studiare le alterazioni molecolari che portano ad ipertensione arteriosa in seguito alla mancanza di Emilina-1 nei piccoli e grandi vasi. In particolare si è deciso di studiare le variazioni delle arterie mesenteriche e dell'aorta di due modelli animali: i topi Emilina-1 knockout (E1KO) e i topi Emilina-1 knockout condizionali indotti da Tamoxifen (flox-flox). Nel primo modello il gene di questa proteina non viene espresso dalla nascita sia nelle cellule muscolari lisce che nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni, nel secondo la perdita di Emilina-1 viene indotta solo nelle cellule muscolari lisce dopo la nascita. Il confronto con condizionali è stato scelto in quanto l'aumento delle resistenze periferiche nei topi Emilina-1 KO potrebbe essere influenzato dalla presenza di vasi costitutivamente più piccoli. Tale fenotipo non è stato riscontrato in topi Emilina-1 KO condizionali: in questi topi la perdita di Emilina-1 determina elevati livelli di pressione arteriosa indipendenti dal rimodellamento tissutale dei vasi. Come controlli sono stati usati rispettivamente topi sani (C57) e topi trattati con Tamoxifen (wt).

Per poter caratterizzare questi due modelli è stato scelto un approccio proteomico in quanto permette di indagare i cambiamenti dell'espressione proteica totale di un tessuto in seguito alla presenza/assenza di una proteina, mostrando come questa variazione influenzi l'equilibrio fisiologico del tessuto favorendo, inoltre, l'individuazione di vie di segnale cellulari alterate.

Al fine di ottenere una lista più completa delle differenze di espressione proteica, sono state utilizzate due tecniche proteomiche complementari: la 2D-DIGE (*Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis*) e l'ICPL (*Isotope-Coded Protein Labeling*). L'accoppiamento di queste due tecnologie permette di caratterizzare meglio il pattern di espressione proteica dei campioni, consentendo la comprensione dei meccanismi

coinvolti nell'insorgenza della patologia e l'identificazione di eventuali biomarcatori associati all'ipertensione.

Infine, per comprendere come viene regolata l'espressione delle proteine differenzialmente espresse, identificate mediante queste due tecnologie proteomiche, si è scelto di effettuare un'analisi di arricchimento in silico dei siti di legame di fattori di trascrizione (TFBS, *Transcription Factor Binding Sites*). Quest'analisi permette infatti di individuare i meccanismi che inducono l'espressione genica di un gruppo di proteine.

In sintesi questo lavoro si propone di:

- identificare le variazioni proteiche nei vasi sanguigni in seguito a carenze di Emilina-1 in due modelli animali;
- comprendere i meccanismi molecolari che si attivano all'interno della cellula in ipertensione, al fine di individuare possibili marcatori biologici della patologia.



## 6. MATERIALI E METODI

### 6.1 Modello sperimentale e prelievo del tessuto

Per lo studio sono stati utilizzati topi maschi C57, Emilina1 knockout (E1KO) e Emilina1 knockout specifici per le cellule della muscolatura liscia vascolare inducibili da Tamoxifen (Emilin1<sup>flox/flox</sup>;Smmhc-Cre-ERT<sup>2</sup>). Rispettivamente topi sani C57 wild-type (C57) e topi Smmhc-Cre-ERT<sup>2</sup> (wt) trattati con Tamoxifen per 13 giorni di pari età e sesso sono stati usati come controlli. I topi sono stati mantenuti ad una temperatura di  $21 \pm 1$  °C, ad una umidità relativa del  $55 \pm 10\%$  ed a 12 ore di luce fino al momento del sacrificio. Cibo (*standard pellets*) ed acqua sono stati forniti *ad libitum*. Gli animali sono stati sacrificati per dislocazione cervicale ed i vasi sono stati rapidamente rimossi e congelati in azoto liquido.

Sono state prese tutte le precauzioni per evitare lo scongelamento del tessuto durante la preparazione del campione, in modo da impedire l'attivazione di processi degradativi dovuti alle proteasi presenti al suo interno, che potrebbero compromettere la qualità del risultato finale.

### 6.2 Tecnica 2D-DIGE

La 2D-DIGE (*Two Dimensional Differential In Gel Electrophoresis*) è una tecnica proteomica quantitativa che consente la separazione, all'interno dello stesso gel bidimensionale, di 2 o più campioni proteici pre-marcati. La marcatura viene effettuata usando fluorofori della famiglia delle cianine, denominati Cy2, Cy3 e Cy5, che hanno lunghezze d'onda d'eccitazione e di emissione diverse. Essi sono molecole che contengono un gruppo estere N-idrossisuccinilico, che è in grado di formare legami covalenti con il carbonio  $\epsilon$  del gruppo amminico delle lisine senza modificare le proprietà chimico-fisiche delle proteine stesse.

Il primo vantaggio derivato dall'introduzione dei fluorofori è che due campioni, marcati con due fluorofori differenti, possono essere fatti migrare

all'interno di uno stesso gel. Il secondo è l'introduzione dello standard interno. Quest'ultimo viene preparato miscelando quantità uguali di ogni estratto proteico facente parte del disegno sperimentale, che viene poi marcato con un fluoroforo e fatto migrare unitamente a ciascun campione marcato con un fluoroforo differente. Questo permette, nella successiva fase di analisi, di effettuare una normalizzazione degli spot proteici per eliminare le eventuali variazioni sperimentali ed evidenziare quelle che sono le reali variazioni biologiche.

### **6.2.1 Estrazione proteica**

L'obiettivo dell'estrazione proteica è quello di raggiungere il maggior grado di solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine contenute nel campione biologico. Essa consiste nella lisi cellulare e nella solubilizzazione delle proteine.

La lisi cellulare favorisce la distruzione delle cellule mediante tecniche meccaniche come la sonicazione. Mentre la solubilizzazione delle proteine avviene aggiungendo al campione proteico un opportuno tampone di lisi. I reagenti contenuti nel tampone sono Urea e Tiourea, agenti denaturanti responsabili della rottura dei legami idrogeno e il CHAPS, detergente zwitterionico che solubilizza le proteine idrofobiche e minimizza l'aggregazione proteica.

Considerando la limitata variabilità interindividuale dei topi provenienti dalla medesima nidiata e cresciuti in condizioni standardizzate, i campioni sono stati uniti in pool in base al loro gruppo di appartenenza e solubilizzati in *lysis buffer* per 2D-DIGE (7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 1mM PMSF, pH 8.5) in rapporto di 6 µl per mg di tessuto. Per assicurare la completa solubilizzazione delle proteine, i frammenti di tessuto sono stati disaggregati mediante 3 cicli di sonicazione a immersione, mantenendo la soluzione in ghiaccio. Gli estratti sono stati centrifugati una prima volta per

20 min a 12000 g a 20 °C, per eliminare l'eventuale materiale non solubilizzato. Il surnatante è stato prelevato, sottoposto a 3 ulteriori cicli di sonicazione e ricentrifugato a 16000 g per 40 min. Il surnatante così ottenuto è stato conservato a -80 °C per le analisi successive.

### **6.2.2 Preparazione dei campioni alla marcatura**

La 2D-DIGE è basata sulla marcatura degli estratti proteici prima della separazione bidimensionale. Perché questo passaggio avvenga correttamente è necessario controllare il pH dell'estratto e misurarne la concentrazione proteica.

La solubilizzazione delle proteine tende ad acidificare il tampone di lisi, perciò il pH degli estratti è stato misurato mediante l'impiego di cartine tornasole (*Sigma-Aldrich*) e riportato tra 8 e 9 mediante l'aggiunta di NaOH 1 M.

La concentrazione proteica è stata determinata mediante il *kit PlusOne 2-D Quant Kit (GE Healthcare)*. La procedura prevista dal kit si basa su una precipitazione quantitativa delle proteine solubilizzate eliminando le sostanze interferenti che invece rimangono in soluzione, quali detergenti, riducenti, anfoline, Urea e Tiourea. Le proteine precipitate sono risospese in una soluzione contenente ioni rame in grado di legarsi in maniera specifica alle molecole proteiche. Gli ioni rame rimasti liberi in soluzione reagiscono con una seconda soluzione (*Working color reagent*) con lo sviluppo di colore che risulta essere inversamente proporzionale alla quantità di proteina contenuta. La concentrazione proteica del campione viene ottenuta per confronto con i valori di assorbanza di una apposita curva standard creata con quantità crescenti di una soluzione di BSA a concentrazione nota.

### 6.2.3 Marcatura dei campioni

In questo lavoro si è adottato un protocollo quantitativo per la marcatura chiamato *Minimal Labeling*, in cui il fluoroforo si lega al 1-2% delle lisine disponibili e solo ad una lisina per molecola proteica.

Sono stati utilizzati due fluorofori (*CyDye DIGE, GE Healthcare*): Cy3 per la marcatura dello standard interno e Cy5 i singoli campioni. I fluorofori vengono forniti liofilizzati e devono essere ricostituiti in DMF in modo tale da ottenere una concentrazione di CyDye pari a 1 mM (*stock solution*). A partire dalla *stock solution* è stata preparata una soluzione di CyDye 400 mM (*working solution*): ciascun  $\mu\text{l}$  di *working solution* contiene 400 pmoli di CyDye sufficienti per marcare 50  $\mu\text{g}$  di estratto proteico. Per ogni campione sono stati marcati 150  $\mu\text{g}$  di proteine con il Cy5 e 150  $\mu\text{g}$  di proteine con il Cy3, per separare ogni estratto in triplicato. La reazione di marcatura è stata effettuata per 30 minuti in ghiaccio, al buio e bloccata con L-Lisina 10 mM. Dopo l'aggiunta della lisina, i campioni sono stati lasciati 10 minuti in ghiaccio al buio e successivamente è stato aggiunto un volume di 2X *sample buffer* (Urea 8 M, DTT 130 mM, CHAPS 4%, anfoline pH 3-10 1%).

### 6.2.4 Prima dimensione: isoelettrofocalizzazione

L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è un metodo elettroforetico ad alta risoluzione che separa le proteine in base al loro punto isoelettrico (pI). Questa è stata effettuata su *IPG strip (Immobiline Dry Strip Gel, GE Healthcare)*, strisce di gel disidratate di acrilamide e bisacrilamide (T=4% C=3%) co-polimerizzate su un supporto in plastica con un'apposita miscela di immobiline che formano il gradiente di pH (le strip utilizzate hanno un gradiente di pH 3-10 non lineare e sono lunghe 24 cm). Prima dell'uso le strip devono essere reidratate con un tampone di reidratazione (Urea 7 M, Tiourea 2 M, CHAPS 2%, DTT 65 mM, anfoline 0.5%, e blu di bromofenolo) al quale vengono aggiunti 40  $\mu\text{g}$  di campione marcato con Cy5 e 40  $\mu\text{g}$  di

standard interno marcato con Cy3.

L'isoelettrofocalizzazione viene condotta sull'*IPGphor* (GE Healthcare) a voltaggi molto elevati (fino a 8000 V) e correnti molto basse (fino ad un massimo di 50  $\mu$ A per *IPG strip*). Gli *strip holder* sono appositi contenitori in ceramica che hanno ad ogni estremità un elettrodo, in ognuno di essi viene alloggiata una strip; grazie al contatto del gel con gli elettrodi è possibile condurre l'isoelettrofocalizzazione. Il protocollo di IEF utilizzato è mostrato in Tabella 1. La corsa è suddivisa in 9 step e viene condotta a 20°C, fino al raggiungimento di 75000 Volt ora totali.

Step	Voltaggio (V)	Tempo (h)
Reidratazione	30	6
Reidratazione	60	6
I Step	200	1
II Step	500	1
III Step	1000	1.5
IV Step	2000	1.5
V Step	3000	1.5
VI Step	3000-8000	4
VII Step	8000	7*

**Tabella 1: Protocollo utilizzato per l'isoelettrofocalizzazione.**

(\*) La corsa viene fermata quando si raggiungono gli 75000 volt-ora totali.

### **6.2.5 Equilibratura delle strip**

Al termine della separazione isoelettroforetica le strip vengono equilibrate allo scopo di ridurre i ponti disolfuro con un agente riducente (ditiotreitolo,

DTT), di alchilare i gruppi sulfidrilici, bloccandoli definitivamente. con un agente alchilante (iodoacetamide) e di rivestire le proteine di cariche negative (mediante dodecilsolfato di sodio, SDS).

L'equilibratura delle strip prevede due passaggi: nel primo le *strip* vengono messe a contatto con il tampone di equilibratura contenente DTT 65 mM per 15 minuti, nel secondo con il tampone di equilibratura contenente iodoacetamide 135 mM per 8 minuti.

Il tampone di equilibratura è composto da Urea 6 M, glicerolo 20%, 375 mM Tris HCl pH 8.8, SDS 2%. L'urea, insieme al glicerolo, riduce l'effetto di elettroendosmosi che interferirebbe con il trasferimento in seconda dimensione delle proteine. La quantità di SDS che si lega alle proteine è proporzionale alla loro massa, in modo che la separazione elettroforetica delle proteine in presenza di SDS avvenga in base alla massa molecolare. L'SDS denatura le proteine e le riveste di cariche negative consentendo la loro migrazione verso l'anodo.

I passaggi d'equilibratura vengono condotti in agitazione moderata su un apposito apparecchio, l'*Immobiline Dry Strip Reswelling Tray* (GE Healthcare).

#### **6.2.6 Seconda dimensione: SDS-PAGE**

La seconda dimensione consiste in un'elettroforesi su gel di poliacrilammide condotta in presenza di SDS, in cui le proteine migrano sulla base della loro massa molecolare.

Per effettuarla è stato utilizzato il sistema verticale *Ettan Dalt twelve* (GE Healthcare), che permette la separazione contemporanea di 12 gel. I gel (25 x 20 cm), aventi lo spessore di 1 mm, sono stati polimerizzati contemporaneamente in un'apposita camera di polimerizzazione (*Ettan Dalt II gel caster*, GE Healthcare). La soluzione di *Running gel* è costituita da 12% Acrilamide/Bisacrilamide a partire da una *soluzione stock* 40% T,

2.5% C, Tris HCl 375 mM, pH 8.8, acqua ultrapura fino a volume. La miscela viene degasata per 20 minuti per favorire l'eliminazione dell'ossigeno che interferirebbe con la polimerizzazione del gel. Infine sono stati aggiunti iniziatore e catalizzatore della polimerizzazione: rispettivamente APS (ammonio persolfato) e TEMED (N,N,N,N'-tetramethylethylene-diamine) con concentrazioni finali rispettivamente pari a 0.5% e 0.03%.

Dopo l'equilibratura, le strip vengono tamponate con carta da filtro per eliminare la soluzione di equilibratura in eccesso. Con una pipetta *Pasteur* viene depositata una soluzione di agarosio allo 0.5% in tampone di corsa sulla sommità del gel, per poter far aderire le strip orizzontalmente al gel di seconda dimensione.

La seconda dimensione viene condotta in tampone di corsa per SDS-PAGE (Tris HCl 25 mM, glicina 0.192 M, SDS 0.1%) e il protocollo utilizzato per 12 gel è mostrato in Tabella 2.

Step	Corrente	Tempo (h)
1	30	2
2	60	1
3	200	Overnight*

**Tabella 2: Protocollo utilizzato per l'SDS-PAGE.**

(\*) La corsa termina quando il blu di bromofenolo fuoriesce dal gel.

### **6.2.7 Acquisizione delle immagini**

L'acquisizione delle immagini consiste nella scansione dei gel con un particolare scanner a doppio raggio laser (*Typhoon 9200 variable mode imager, GE Healthcare*). Lo scanner acquisisce due immagini per ciascun gel, una per lo standard interno marcato con Cy3 e l'altra per il campione

marcato con Cy5. Le proteine marcate con il Cy3 sono state visualizzate utilizzando il laser verde (532 nm) con filtro di emissione a 580 BP, quelle marcate con Cy5 con laser rosso (633 nm) con filtro di emissione a 670 BP. Inoltre è stato impostato il parametro PMT (fotomoltiplicatore), il quale permette di controllare la saturazione delle macchie proteiche visualizzate sulla mappa (la risoluzione è stata impostata a 100 micron). Prima dell'analisi le immagini sono state tagliate, al fine di eliminare le aree estranee, utilizzando il programma *ImageQuant* (GE Healthcare).

### 6.2.8 Analisi delle immagini

L'analisi d'immagine viene effettuata utilizzando un software (*DeCyder software*, GE Healthcare), creato appositamente per studiare l'espressione proteica differenziale di campioni marcati con fluorofori. Il software è caratterizzato da un particolare algoritmo, in grado di effettuare la co-detection di campioni differenzialmente marcati e separati all'interno dello stesso gel. Le operazioni di *detection*, sottrazione del *background*, quantizzazione, normalizzazione e *inter-gel matching* avvengono in modo completamente automatico, o in ogni caso con un minimo intervento dell'operatore.

Il programma si avvale dei seguenti moduli per analizzare i gel di un esperimento:

- Imager Loader;
- DIA (*Differential In-gel Analysis*);
- BVA (*Biological Variation Analysis*);
- Batch Processor;
- EDA (*Extended Data Analysis*).

Le immagini dei gel vengono importate nel *DeCyder 2D database* mediante l'utilizzo dell'apposito modulo *Image Loader*.



#### **6.2.8.1 Il modulo DIA (*Differential In-gel Analysis*)**

Il modulo DIA consente di effettuare: il riconoscimento (*spot detection*), la quantizzazione, la sottrazione del *background* e la normalizzazione delle macchie proteiche. La *spot detection* definisce il contorno delle macchie proteiche e ne misura area, altezza, volume e pendenza. Il volume di ogni macchia proteica corrisponde alla somma dell'intensità dei pixel che si trovano all'interno dei confini di ciascuna macchia. Il modulo ne calcola inoltre l'abbondanza espressa come rapporto tra il volume della macchia marcata con Cy5 e la rispettiva marcata con Cy3 (*standard interno*). Il software sottrae al volume di ogni macchia il valore di *background* che consiste nel più basso valore di decimo percentile dei pixel presenti sul confine di ogni macchia. La *spot detection* viene effettuata in modo automatico dal software, questo comporta che impurità non proteiche dovute all'eterogeneità del gel e aree molto piccole non contenenti spot vengano invece considerate come spot. Questi ultimi possono essere rimosse applicando particolari filtri raggruppati nella funzione *Exclude Filter* (*Max slope* > 1.2, *Volume* < 15000, *Peak height* < 30 e > 100000).

#### **6.2.8.2 Il modulo BVA (*Biological Variation Analysis*)**

Il modulo BVA permette di eseguire: il *Matching* multiplo tra gel, la comparazione e l'analisi statistica delle abbondanze proteiche tra i gruppi sperimentali per la rilevazione di spot significativamente variate.

Viene scelto, automaticamente o dall'operatore, un gel chiamato *Master Gel*, che contiene il maggior numero di macchie proteiche. Tutti i gel dell'esperimento sono poi confrontati con il master gel, in modo che ciascuna macchia di ciascun gel risulti associata alla corrispondente macchia nel *Master Gel* (*Gel Matching*). Se la migrazione della macchia in gel diversi non dovesse risultare identica, è possibile utilizzare la funzione *landmarking* per associare manualmente le macchie e garantire

l'accuratezza del *gel-to-gel matching*. Infine viene effettuato manualmente un controllo per eliminare eventuali errori nel *matching (mismatch)*.

Il modulo *Batch Processor* implementa le funzioni dei moduli DIA e BVA svolgendo in modo completamente automatizzato la *spot detection*, la quantizzazione ed il *matching* delle macchie.

### **6.2.8.3 Il modulo EDA (*Extended Data Analysis*)**

Il modulo EDA permette di analizzare un insieme ampio e complesso di dati derivanti da studi proteomici. Attraverso l'applicazione di diversi test statistici e di sofisticati metodi di *clustering*, permette di effettuare analisi a più variabili sui dati d'espressione proteica derivanti dal modulo BVA, raggruppandoli secondo modelli comuni d'espressione. È suddiviso in tre parti chiamate *Setup*, *Calculation* e *Results*.

Nella fase di *Setup* vengono importati i dati dal BVA, i gel importati vengono assegnati ad un gruppo sperimentale. Con questi dati viene creato il *Base set* che rappresenta l'insieme dei dati sui quali si baseranno le analisi successive. I parametri applicati per la creazione del *Base set* sono: *% of spot maps where protein is present > 90*, per includere solo le macchie presenti nel 90% dei gel, e *Remove unassigned spot maps*, per eliminare i gel che non sono stati assegnati ad alcun gruppo sperimentale.

Nella seconda fase, quella di *Calculation*, vengono impostate le analisi statistiche che si desiderano eseguire sul *Base set*. Le analisi statistiche sono di tre tipologie: *Differential expression analysis*, *Principal components analysis* e *Hierarchical clustering*. I risultati ottenuti da queste analisi possono essere visualizzati nella sezione *Results*.

In questo lavoro è stata utilizzata la funzione *Differential expression analysis* che permette di eseguire lo *Student's T-test* per determinare le macchie differenzialmente espresse tra i gruppi sperimentali. Come livello di significatività statistica è stato scelto 0,01 (*p value*). Il software fornisce

inoltre una misura quantitativa dell'entità della variazione, *Average Ratio* (o *Fold change*). Esso indica il *ratio* del volume standardizzato tra i due gruppi ed è calcolato come segue:

$$Average Ratio = \frac{ma}{mb}$$

Dove “ma” ed “mb” indicano il valore medio del valore d'espressione del gruppo a o del gruppo b. Come livello di significatività di *Av. Ratio* è stato scelto 1,2.

È stata inoltre applicata la *Principal components analysis* (PCA) per visualizzare la distribuzione dei gel e delle macchie proteiche del disegno sperimentale, favorendo così l'identificazione eventuali *outliers*. La PCA è infatti un calcolo utilizzato nell'ambito della statistica multivariata che ha lo scopo di semplificare le complesse variabili caratteristiche di un sistema, proiettandole in un nuovo sistema cartesiano dove vengono ordinate in ordine decrescente di varianza. In questo nuovo sistema cartesiano, la nuova variabile con la maggiore varianza viene proiettata sul primo asse (PCA1), la seconda per dimensione di varianza, sul secondo asse (PCA2) e così via.

### **6.3 Identificazione delle proteine**

L'identificazione degli spot proteici viene effettuata mediante allestimento di gel preparativi e comporta: la separazione bidimensionale in gel, la colorazione con colorante, l'escissione delle macchie proteiche e l'identificazione mediante spettrometria di massa MALDI delle proteine contenute nei frammenti di gel. Dalle mappe preparative, oltre alle macchie risultate variate dall'analisi 2D-DIGE, vengono prelevate la maggior parte delle macchie visibili con la colorazione per creare una *mappa standard* del tessuto in esame.

### 6.3.1 Separazione bidimensionale

Per identificare le proteine risultate statisticamente variate dall'analisi d'immagine sono stati allestiti dei gel preparativi da estratti proteici di aorta e arterie mesenteriche di topo, ottenuti con la procedura per l'analisi 2D-DIGE.

È stato creato un pool composto da un uguale quantità proteica dei campioni dell'esperimento e sono stati preparati tre gel preparativi, ognuno caricando 250 µg di proteine.

Il protocollo e le condizioni di corsa utilizzate per la separazione in prima e la seconda dimensione sono state le stesse impiegate per i gel analitici. Nella procedura per la polimerizzazione dei gel preparativi però i vetri inferiori devono essere ricoperti da una soluzione di *Bind Silane* (γ-methacryloxypropyltrimethoxysilane) che permette al gel di poliacrilammide di legarsi in modo covalente alla superficie del vetro; il loro fissaggio è fondamentale per la colorazione e per il successivo prelievo automatico delle macchie dal gel per l'identificazione.

Su ogni vetro vengono distribuiti uniformemente 7 ml di soluzione *Bind Silane* (80% etanolo, 1% acido acetico, 0.2% *Bind Silane* ed acqua bidistillata). Dopo che la soluzione è evaporata si posizionano dei *marker* di carta bianca adesiva sulla superficie del vetro, che serviranno come riferimenti per la creazione della *pick list*.

### 6.3.2 Colorazione con Lava Purple

Per poter prelevare dal gel le macchie di interesse, è necessario poterle visualizzare. Si utilizza perciò un colorante che si lega in modo reversibile alle proteine e che non interferisce con la successiva identificazione mediante spettrometria di massa. Il *LavaPurple*<sup>™</sup> è basato su un piccolo composto fluorescente (epicocconone, un prodotto naturale biodegradabile) che si lega reversibilmente ai residui di lisina, arginina e

istidina di proteine e peptidi per produrre un prodotto fluorescente di colore rosso intenso.

La colorazione si divide in quattro fasi: fissaggio, colorazione, lavaggio e stabilizzazione, in cui i gel preparativi vengono immersi in soluzioni differenti secondo il seguente protocollo:

- Fissaggio: 10 g di acido citrico in 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata, pH 2.3; incubazione *over night*;
- Colorazione: Lava Purple viene diluito di 200 volte in una soluzione contenete 6.2 g di acido borico e 3.85 g di NaOH in 1 litro di acqua bidistillata, pH 10.5; incubazione 1 ora;
- Lavaggio: 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata; incubazione 30 minuti; il lavaggio serve per eliminare l'eccesso di soluzione di colorazione e diminuire il *background*.
- Stabilizzazione: 10 g di acido citrico in 150 ml di etanolo e 850 ml di acqua bidistillata, pH 2.3; incubazione 30 minuti.

### **6.3.3 Acquisizione e analisi delle immagini**

Completata la procedura di colorazione, le immagini dei gel preparativi sono state acquisite mediante *Typhoon 9200 variable mode imager* (GE Healthcare) impostando i seguenti parametri: la lunghezza d'onda per il laser verde (532 nm) con filtro di emissione a 560 LP e PMT 590, risoluzione 100 micron.

Per l'analisi delle immagini e la creazione della lista delle macchie da prelevare dai gel preparativi (*pick list*), è stato utilizzato il *Software DeCyder 2D*. Le immagini sono state importate nel database mediante il modulo *Image Loader* ed inserite nel corrispondente esperimento 2D-DIGE, in modo da poter utilizzare lo stesso master gel.

Nel modulo DIA viene eseguita la *spot detection* e vengono riconosciuti i *marker* posizionati sul vetro, i quali verranno presi come riferimenti (R1 e

R2) per calcolare le coordinate delle macchie proteiche da prelevare.

Nel modulo BVA viene eseguito il *matching* delle macchie con il *master gel* e viene creata la *pick list*. La *pick list* è l'insieme delle coordinate (x,y) di ogni macchia del gel rispetto ai riferimenti, che vengono utilizzate dallo *spot picker* per il prelievo.

#### **6.3.4 Spot Picker**

L'*Ettan Spot Picker* è uno strumento che esegue il prelievo automatizzato delle macchie da gel bidimensionali. Il prelievo delle macchie (*picking*) è definito come la rimozione del materiale (*plug*) di interesse dai gel di poliacrilammide e la sua erogazione in una piastra microforata da 96 pozzetti.

L'*input* necessario per eseguire il prelievo degli spot è dato dal gel, immobilizzato su un supporto di vetro o plastica, e dalla corrispondente *picking list* contenente le informazioni sulla posizione di ciascuna macchia che deve essere prelevata. Il processo di prelievo si basa sulle coordinate x,y di ogni macchia proteica che forniscono allo strumento la posizione esatta al millimetro della macchia da prelevare. Dopo l'excisione dal gel, i *plug* sono posati in micropiastre standard da 96 pozzetti insieme ad una piccola quantità d'acqua per evitare la disidratazione. L'efficienza di prelievo è superiore al 99.86%.

#### **6.3.5 Idrolisi in situ ed analisi mediante spettrometria di massa**

L'identificazione delle proteine mediante analisi di spettrometria di massa avviene secondo il *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) che si basa sulla misura dei rapporti m/z dei peptidi derivanti dalle proteine in esame. L'analisi di spettrometria di massa viene preceduta dall'idrolisi delle proteine in peptidi ad opera di agenti chimici o enzimi proteolitici che agiscono in siti specifici lungo la catena polipeptidica. I valori di massa dei

digeriti vengono poi confrontati con quelli raccolti nel database derivati da digeriti virtuali per risalire all'identità della proteina.

Gli spot prelevati con l'*Ettan Spot Picker* sono stati idrolizzati con tripsina, un enzima che cliva le proteine nei siti contenuti arginina e lisina nella regione C-terminale. Il colorante utilizzato per la visualizzazione delle macchie proteiche viene allontanato mediante 4 lavaggi consecutivi con una soluzione 50 mM di metanolo e ammonio bicarbonato (AMBIC) 1:1. Successivamente gli spot vengono ricoperti con acetonitrile (ACN) con lo scopo di deidratare il gel, provvedendo così ad una veloce estrazione delle componenti a basso peso molecolare come SDS e *Lava Purple*. Alla completa deidratazione del gel l'ACN viene rimosso, sostituito con una soluzione 100 mM AMBIC contenente tripsina 5ng/μl e gli spot incubati a 4°C per due ore. In questo modo l'enzima entra nelle maglie del gel evitando però la sua autoproteolisi. La soluzione viene rimossa e sostituita con AMBIC 10 mM allo scopo di eliminare la tripsina in eccesso e ridurre, così, i segnali relativi all'autoproteolisi e i campioni vengono incubati a 37°C per tutta la notte. Infine si recupera la soluzione presente dopo l'idrolisi mediante ulteriori passaggi di estrazione dei peptidi, idratando con AMBIC 10mM, deidratando il gel con ACN e, infine, reidratandolo ulteriormente con acido formico 0.1%.

Per aumentare la concentrazione dei peptidi nella soluzione, le provette sono state messe nel concentratore *Speed Vac Concentrator* (*Savant*) per ridurre il volume del liquido fino a circa 5-10 μl.

Per l'analisi dei peptidi è stato utilizzato uno spettrometro di massa MALDI, Ultraflex III ToF-ToF. 1 μl di campione è stato co-cristallizzato sulla piastrina portacampione con un egual volume di una soluzione 10 mg/ml di α-Ciano (CHCA) in 50% ACN e 1% TFA. Per la calibrazione dello strumento in modalità reflectron è stata utilizzata una miscela di peptidi standard che ha permesso una calibrazione esterna multipoint. I dati collezionati mediante

MALDI/MS sono stati utilizzati per l'identificazione delle proteine incognite in banca dati con il *software Mascot*.

Il pattern di masse molecolari derivanti dall'idrolisi della proteina viene confrontato con il pattern di pesi molecolari teorici derivanti dalla proteolisi di ognuna delle proteine in banca dati (*peptide mass fingerprint fitting*). Ad ogni proteina è associato un indice di probabilità (*score*) calcolato come  $-10 \times \log(P)$ , dove P indica la probabilità che l'evento osservato sia casuale.

#### **6.4 Tecnica ICPL**

L'*ICPL (Isotope-Coded Protein Label)* è una tecnica che si basa sulla marcatura di gruppi aminici liberi di proteine intatte con isotopi stabili. Questa metodologia è adatta per tutti i tipi di campioni proteici, inclusi estratti tissutali o fluidi biologici e permette di quantificare più campioni differenti nello stesso esperimento: gli estratti proteici vengono marcati con diversi reagenti isotopici e uniti. La complessità della miscela proteica viene ridotta mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide, le frazioni così ottenute vengono digerite con tripsina e i peptidi separati mediante cromatografia in fase liquida e analizzati tramite MS/MS. Il processo consente la quantificazione di un ampio *range* proteico in modo efficiente, accurato e riproducibile.

##### **6.4.1 Estrazione proteica**

Ai fini di permettere la completa solubilizzazione e disaggregazione delle proteine contenute nei campioni biologici, l'estrazione proteica viene eseguita con un apposito tampone di lisi che non contiene agenti con amino gruppi primari che potrebbero interferire con la marcatura ICPL.

Considerando la limitata variabilità interindividuale dei topi provenienti dalla medesima nidiata e cresciuti in condizioni standardizzate, i campioni sono stati uniti in pool in base al loro gruppo di appartenenza e solubilizzati in



*lysis buffer per ICPL* (6 M guanidina-HCl pH 8.5, *ICPL kit, SERVA*) con aggiunta di inibitori delle proteasi e delle fosfatasi, in modo da ottenere una concentrazione finale di circa 5 ug/ul. Per assicurare la completa solubilizzazione delle proteine, i frammenti di tessuto sono stati disgregati mediante 3 cicli di sonicazione a immersione, mantenendo la soluzione in ghiaccio. Gli estratti sono stati centrifugati per 20 min a 12000 g a 20°C, per eliminare l'eventuale materiale non solubilizzato. Il surnatante così ottenuto è stato conservato a -80 °C per le analisi successive.

#### **6.4.2 Preparazione dei campioni alla marcatura**

La marcatura con isotopi ICPL è ottimizzata per concentrazioni proteiche di 5 mg/ml in un tampone a pH 8.5. Perché questa avvenga correttamente è necessario avere circa 100 µg di proteine in 20 µl, per ogni campione. Inoltre le proteine devono essere carbaminometilate, in modo che i ponti disolfuro siano ridotti e i gruppi sulfidrilici delle cisteine alchilati.

La concentrazione dei campioni è stata determinata mediante *2D-Quant Kit* (*GE Healthcare*) come precedentemente descritto e gli estratti sono stati portati a pH 8.5 con l'aggiunta di HCl 1M utilizzando cartine tornasole (*Sigma-Aldrich*).

La carbaminometilazione delle proteine è stata effettuata mediante due passaggi: nel primo i campioni vengono messi a contatto 0.5 µl di *reduction solution* per 30 min a 60°C, per ridurre i ponti disolfuro, nel secondo con 0.5 µl di iodoacetamide per 30 min a 25°C al buio, per permettere l'alchilazione dei residui di cisteina. La reazione di alchilazione viene fermata incubando i campioni per 15 min a 25°C con un eccesso di N-acetil-cisteina.

#### **6.4.3 Marcatura dei campioni**

La marcatura dei campioni è stata effettuata utilizzando il *SERVA ICPL™ Quadruplex PLUS Kit* (*SERVA*), che permette l'analisi quantitativa di

quattro campioni contemporaneamente.

Dopo aver controllato il pH, 100 µg di proteine di ogni campione sono stati marcati per 2 ore a temperatura ambiente aggiungendo 3 µl di *ICPL\_0 Reagent* al campione A, 3 µl di *ICPL\_4 Reagent* al campione B, 3 µl di *ICPL\_6 Reagent* al campione C e 3 µl di *ICPL\_10 Reagent* al campione D. La marcatura è stata bloccata mediante legame con un eccesso di idrossilammina e i diversi campioni sono stati uniti. Il pH è stato portato a 11.9 con NaOH per distruggere possibili prodotti di esterificazione e neutralizzato con una stessa quantità di HCl dopo 20 min a 25°C. La marcatura è stata poi ripetuta su altre aliquote degli stessi campioni combinando campioni e isotopi in modo diverso come in tabella 3.

Campione	Marcatura 1	Marcatura 2
A	ICPL_0	ICPL_4
B	ICPL_6	ICPL_10
C	ICPL_4	ICPL_0
D	ICPL_10	ICPL_6

**Tabella 3: Schema marcatura campioni con isotopi ICPL.**

Gli estratti proteici sono stati purificati mediante *clean-up* (*2D Clean-Up Kit*, *GE Healthcare*), che consiste in una precipitazione selettiva delle proteine per eliminare tutte le sostanze non proteiche, e dissolti in 7 M Urea, 2 M Tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Tris, 1mM PMSF, pH 8.5.

#### **6.4.4 Controllo della marcatura**

Per verificare che la marcatura sia avvenuta correttamente il *Kit ICPL* contiene quattro *Protein Mix* (PM per ICPL\_0, ICPL\_4, ICPL\_6 e ICPL\_10), ognuna composta da differenti quantità di tre proteine standard (tabella 4).

Proteina	Protein Mix per ICPL_0	Protein Mix per ICPL_4	Protein Mix per ICPL_6	Protein Mix per ICPL_10	Abbondanza relativa
BSA	13.5 µg	13.5 µg	13.5 µg	13.5 µg	1:1:1:1
Ovalbumin (chicken)	24 µg	12 µg	6 µg	24 µg	1:0.5:0.25:1
Carbonic Anhydrase II (bovine)	12 µg	12 µg	24 µg	12 µg	1:1:2:1

**Tabella 4: Composizione Protein Mix per ICPL (SERVA).**

Le *Protein Mix* vengono fornite liofilizzate e sono state ricostituite in 20 µl di *lysis buffer per ICPL* (6 M guanidina-HCl pH 8.5). Seguendo il protocollo descritto precedentemente, sono state carbaminometilate, marcate con i rispettivi isotopi e unite. Le proteine sono state poi purificate utilizzando il *2D Clean-Up Kit* e risospese in 50 mM Tris/HCl/2 M urea pH 8.0 in modo da ottenere una concentrazione finale di 5 µg/µl. Il campione è stato poi diluito in 50 mM Tris/HCl, pH 8.0 per avere una concentrazione finale di urea di 1 M e proteica di 2.5 µg/µl.

La miscela così ottenuta viene idrolizzata con due differenti enzimi: Glu-C, un'endoproteinase che cliva le proteine al C-terminale ai residui di acido glutammico, e con tripsina. Le proteine sono state quindi incubate a 25°C per 4 ore in una soluzione contenente Glu-C, secondo un rapporto enzima/proteine del campione 1:10. Poi è stata aggiunta una soluzione di tripsina diluita in acido acetico 50mM in rapporto 1:50 e il campione è stato incubato a 37°C per tutta la notte. Per interrompere la reazione sono stati aggiunti 5 µl di TFA 1%.

Per l'analisi dei peptidi è stato utilizzato uno spettrometro di massa MALDI, Ultraflex III ToF-ToF. 1 µl di campione è stato co-cristallizzato sulla piastrina portacampione con un egual volume di una soluzione 10 mg/ml di α-Ciano (CHCA) in 50% ACN e 1% TFA, come precedentemente descritto.

#### 6.4.5 Riduzione della complessità della miscela proteica

L'analisi proteomica quantitativa mediante tecnologia ICPL permette di pre-frazionare la miscela proteica in modo da ridurre la complessità, pur mantenendo costanti i *ratio* tra i diversi isotopi legati alle proteine durante la marcatura. Questo passaggio incrementa il numero di proteine che verranno identificate e quantificate mediante spettrometria di massa.

La riduzione della complessità della miscela proteica è stata effettuata mediante elettroforesi monodimensionale. Per ogni campione è stato prelevato un volume pari a 200 µg ed aggiunto un volume uguale di tampone di *loading* (Tris HCl, glicerolo 10%, SDS 2%, DTT 20mg/ml, Blu di bromo fenolo, pH 6.8). Ogni campione è stato preparato in duplicato e per ogni pozzetto vengono caricati 100 µg di proteine. Sono stati preparati anche due tipi di *marker* di pesi molecolari noti: il *LMW Marker* e il *HMW Marker* (GE Healthcare).

Per l'elettroforesi monodimensionale è stato impiegato l'apparato *Hoefer™ SE 600 Series Vertical Electrophoresis Systems* e le proteine sono state separate su un gel in gradiente al 8-16% di poliacrilammide.

La corsa elettroforetica è stata condotta ad amperaggio limitante, con correnti crescenti: 30 mA fino all'entrata dei campioni nello *stacking gel*, 40 mA fino all'entrata dei campioni nello *running gel*, 60 mA fino alla fine della corsa, che è stata interrotta quando il fronte di separazione delle proteine ha raggiunto 10 cm dallo *stacking gel*.

Il gel è stato colorato con il colorante fluorescente *SYPRO Ruby Protein Gel Stain* (Molecular Probes® Invitrogen detection technologies). La procedura consiste nel fissare le proteine con una soluzione di fissaggio composta da 7% acido acetico e 50% metanolo in acqua ultrapura per 30 minuti per due volte, seguita dalla colorazione con *Sypro Ruby protein stain* overnight. Il giorno seguente vengono eseguiti due lavaggi da 30 min in una soluzione composta da 7% acido acetico e 10% metanolo in acqua

ultrapura, per eliminare l'eccesso di soluzione di colorazione e diminuire il background. Infine il gel viene messo in acqua ultrapura per 5 min.

L'immagine della colorazione totale è stata visualizzata con lo *scanner laser Typhoon 9200*. Il colorante *Sypro* ha due lunghezze di eccitazione una a 280 nm e una a 450 nm ed ha un'emissione a 618 nm.

Successivamente ogni *lane* del gel è stata tagliata in 20 bande al transilluminatore, le quali sono state posizionate in micropiastre standard da 96 pozzetti insieme ad una piccola quantità d'acqua per evitare la disidratazione.

#### **6.4.6 Idrolisi in situ ed analisi mediante spettrometria di massa**

La quantificazione e l'identificazione proteica delle frazioni si compone delle seguenti fasi: idrolisi in situ delle proteine, separazione dei peptidi mediante cromatografia in fase liquida e analisi tramite MS/MS.

Le proteine sono state digerite con tripsina, come precedentemente descritto, e i campioni sono stati sottoposti a cromatografia liquida a fase inversa. A questo scopo è stato utilizzato un cromatografo multidimensionale in configurazione *high-throughput (nLC, ProteOn)*. I peptidi sono stati separati mediante l'utilizzo di una colonna C-18 (*Prep MAP 100, Waters*) e con un flusso di 300 nl/min. L'analisi cromatografica è stata condotta utilizzando un gradiente che va dal 5% al 60% del tampone B (ACN, FA 0.1%) in 120 minuti. Alla fine la colonna è stata lavata con 100% tampone B per 15 minuti e poi riequilibrata per l'analisi successiva. I peptidi eluiti dalla colonna cromatografia sono stati analizzati utilizzando uno spettrometro di massa con sorgente electrospray e una trappola ionica come analizzatore (*AmaZon Speed ETD, Bruker Daltonics*). Lo strumento è stato programmato per ottenere in continuo uno spettro di massa e gli ioni da frammentare dovevano avere una intensità maggiore di  $1 \times 10^4$ . Lo strumento esegue l'analisi acquisendo spettri di massa delle frazioni eluite

dal sistema cromatografico in un intervallo tra 300 e 1500 m/z, secondo la modalità *data-dependent*. Infine acquisisce gli spettri MS/MS dei venti ioni più abbondanti presenti in ogni spettro MS. E' stata utilizzata un'energia di collisione tra 30 e 60 eV in dipendenza dalla massa e dallo stato di carica dello ione precursore da frammentare.

Gli spettri sono stati elaborati con il *software DataAnalysis (Bruker Daltonics)* e le proteine sono state identificate utilizzando il programma *ProteinScape (Bruker Daltonics)* che si interfaccia con il *software Mascot (www.matrixscience.com)*. Le proteine sono state identificate imponendo i seguenti parametri di ricerca:

- banca dati proteica non ridondante: *Swiss-Prot*;
- enzima proteolitico specifico: tripsina;
- classe tassonomica del campione: *Mus musculus*;
- legame degli isotopi ICPL (ICPL\_0, ICPL\_4, ICPL\_6 e ICPL\_10) ai residui di lisina;
- un unico sito d'idrolisi non riconosciuto dall'enzima lungo la sequenza;
- presenza di S-carboammidometilcisteine;
- presenza di estremità N e C terminali non modificate;
- presenza di metionine ossidate e non ossidate;
- tolleranza pari ad un valore massimo di 0,3 Da;
- tolleranza pari ad un valore massimo di 0,5 Da per la massa del peptide frammento.

Solo le proteine con una misura quantitativa dell'entità della variazione proteica ( $ratio \frac{ICPL_6}{ICPL_0}$  e  $\frac{ICPL_{10}}{ICPL_4}$ ) maggiore di 1,5 o minore di -1,5, con almeno due peptidi diversi in due dei tre replicati biologici, sono state considerate differenzialmente espresse.

### **6.5 Analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione**

Per effettuare l'analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione (TFBS, *transcription factor binding sites*) è stato utilizzato il software online *oPOSSUM 3.0*, il quale permette di studiare in silico la regolazione genica di proteine identificate mediante metodi *high-throughput*. *oPOSSUM 3.0* è in grado infatti di determinare in un insieme di geni co-espressi l'arricchimento di TFBS o delle rispettive famiglie, partendo da liste di geni o da sequenze geniche. La lista dei geni viene quindi recuperata da informazioni genomiche precedentemente annotate in database o prodotta sperimentalmente.

Su queste liste possono essere effettuate quattro tipi di analisi di arricchimento [73] (figura 20):

- *Single Site Analysis (SSA)*, che individua i TFBS arricchiti in una lista di geni o sequenze geniche;
- *Anchored Combination Site Analysis (aCSA)*, che fornisce le combinazioni di TFBS arricchiti in una lista di geni o sequenze geniche;
- *TFBS Cluster Analysis (TCA)*, che identifica gruppi di TFBS arricchiti in un set di sequenze fornite;
- *Anchored Combination TFBS Cluster Analysis (aCTCA)*, che fornisce le combinazioni di gruppi di TFBS arricchiti in un set di sequenze.

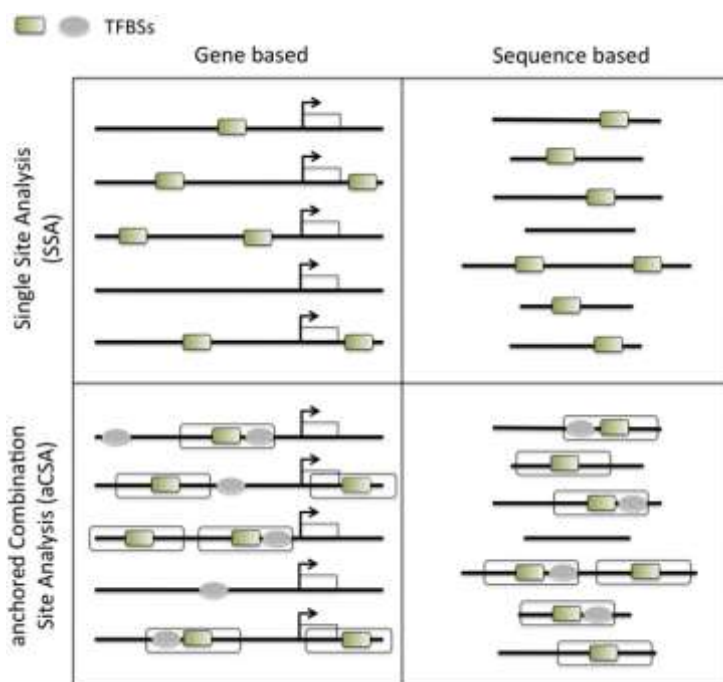
In ogni analisi il software confronta i TFBS individuati nella lista dei geni fornita con quelli contenuti del *database JASPER*, il quale raccoglie i TFBS eucariotici identificati sperimentalmente e documentati in letteratura.

L'arricchimento viene quantificato con due misure di significatività complementari:

- lo *Z-score*, che si basa sull'approssimazione alla normale standardizzata della distribuzione binomiale dei dati di partenza per confrontare la frequenza di un sito nel set di geni forniti rispetto alla sua

frequenza stimata nel database;

- il *Fisher score*, che indica se la proporzione di geni co-espressi che contengono un particolare sito, rispetto alla parte del database che contiene il medesimo sito, è maggiore di quella che si avrebbe se fosse dovuta al caso. Al contrario dello Z-score, il numero di volte che un TFBS viene individuato nel promotore di un singolo gene viene ignorato e il TFBS viene considerato semplicemente presente o assente.



**Figura 20: Schema dei principali tipi di analisi disponibili in oPOSSUM 3.0.**

I dati di partenza possono essere liste geniche o sequenze nucleotidiche, che possono essere analizzate mediante *Single Site Analysis* (SSA) per identificare singoli TFBS arricchiti o mediante *Anchored Combination Site Analysis* (aCSA) per individuare combinazioni di TFBS. Immagine modificata dal lavoro di Kwon e al. 2012 [73].

In questo lavoro il set di partenza utilizzato è stato la lista dei geni codificanti per le proteine statisticamente variare identificate mediante le



tecniche 2D-DIGE e ICPL. Come metodo di analisi è stato adottato il *Single Site Analysis* (SSA). Per ogni fattore di trascrizione, il sistema ha comparato il numero dei geni contenenti il relativo sito di legame nella lista fornita rispetto al *database* restituendo l'elenco dei siti che risultano arricchiti. Per effettuare un'analisi più restrittiva è stato impostato come livello di conservazione della sequenza 0,60 in una regione di 10000 nucleotidi a valle e a monte del sito di legame previsto. Come livello di significatività sono stati considerati arricchiti i siti con *Z-score*  $\geq 10$  e/o *Fisher score*  $\geq 7$ .



## 7. RISULTATI

### 7.1 Disegno sperimentale

Per lo studio sono stati utilizzati due modelli animali: topi C57 Emilina1 *knockout* e Emilina-1 *knockout* specifici per le cellule della muscolatura liscia vascolare (Emilin1<sup>flox/flox</sup>;Smmhc-Cre-ER<sup>T2</sup>). Nel primo modello (E1KO) Emilina-1 non viene espressa dalla nascita sia nelle cellule muscolari lisce che nelle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Nel secondo (flox-flox) il silenziamento del gene Emilina-1 è indotto dopo la nascita da un sistema Cre-lox controllato da Tamoxifen, solo nelle cellule muscolari lisce dei vasi. Come controlli sono stati usati rispettivamente topi sani C57 *wild-type* (C57) e topi Smmhc-Cre-ER<sup>T2</sup> (wt) trattati con Tamoxifen per 13 giorni che esprimono Cre (figura 21).

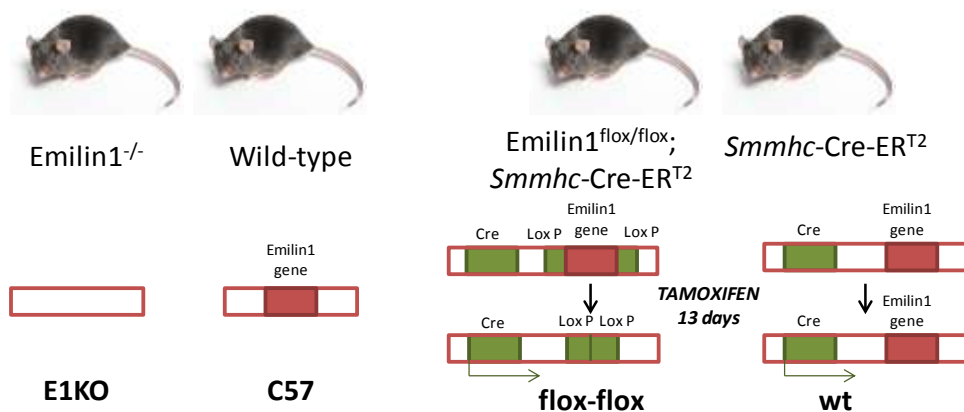


Figura 21: Disegno sperimentale: schema dei modelli animali E1KO e flox-flox.

Al fine di studiare se, e quali, vie di segnale vengono alterate da carenze Emilina-1 è stato effettuato uno studio di analisi differenziale del proteoma sui piccoli e grandi vasi, prelevando le arterie mesenteriche e l'aorta dei due modelli presi in esame. Per poter ottenere una lista più completa delle differenze di espressione proteica tra i gruppi sperimentali, sono state

utilizzate due tecniche proteomiche complementari: la 2D-DIGE e l'ICPL. In particolare sono stati eseguiti i seguenti confronti:

- E1KO vs C57
- flox-flox vs wt

Per identificare le proteine differenzialmente espresse nell'aorta e nelle arterie mesenteriche i campioni sono stati analizzati mediante 2D-DIGE e sono state allestite delle mappe preparative per poter prelevare le macchie d'interesse ed identificarle tramite spettrometria di massa MALDI Tof-Tof. Per individuare ulteriori variazioni, i campioni di aorta sono stati analizzati mediante la tecnica ICPL, che permette di quantizzare le variazioni proteiche utilizzando la cromatografia in fase liquida associata alla spettrometria di massa ESI.

Infine, al fine di approfondire i meccanismi che regolano l'espressione delle proteine differenzialmente espresse identificate è stata effettuata sui promotori dei relativi geni un'analisi di arricchimento in silico dei siti di legame dei fattori di trascrizione, tramite il software online *oPOSSUM 3.0*.

## **7.2 Analisi proteomica 2D-DIGE**

### **7.2.1 Analisi statistica**

Per effettuare un'analisi differenziale quantitativa è necessario che le immagini ottenute dei gel siano elaborate utilizzando un software dedicato, in questo caso il *DeCyder 2D software*. Il primo passaggio di questa analisi consiste nella *spot detection*, la quale si effettua tramite il modulo DIA (*Differential in-gel analysis*), che permette di rivelare le macchie presenti nella mappa bidimensionale e la loro abbondanza. In media, per gel, il numero delle macchie incluse sono state 2000.

Il secondo passaggio prevede l'utilizzo del modulo BVA che permette: una valutazione più fine delle macchie rilevate, la scelta del *master gel* (il gel rappresentativo di tutte le macchie proteiche di tutti i gel dell'esperimento),

l'assegnazione dei gel ai gruppi sperimentali e il *gel matching*.

Infine le abbondanze delle macchie fornite dal *software* vengono elaborate con il modulo EDA, che consente di effettuare l'analisi statistica. Il test statistico applicato in questo lavoro è stato lo *Student's T-test*, tra i gruppi C57 e E1KO ed i gruppi wt e flox-flox. Le macchie differenzialmente espresse con livello di significatività statistica  $< 0,01$  sono state considerate macchie d'interesse (o *protein of interest* abbreviato in POI). Il *software* fornisce anche una misura quantitativa dell'entità della variazione, *Average Ratio*, indicando con il segno positivo un aumento della abbondanza proteica e con il segno negativo una sua diminuzione. Come livello di significatività di *Av. Ratio* è stato scelto 1,2.

Inoltre con lo scopo di determinare la significatività del disegno sperimentale e l'eventuale presenza di gel "*outliers*" è stata condotta la *PCA (Principal Component Analysis)*, in cui l'80-90% della variabilità del *dataset* è definita dalla componente 1 (PCA1). Nel grafico di PCA ogni gel è rappresentato da un cerchio ed il colore indica il gruppo sperimentale di appartenenza (tabella 5).

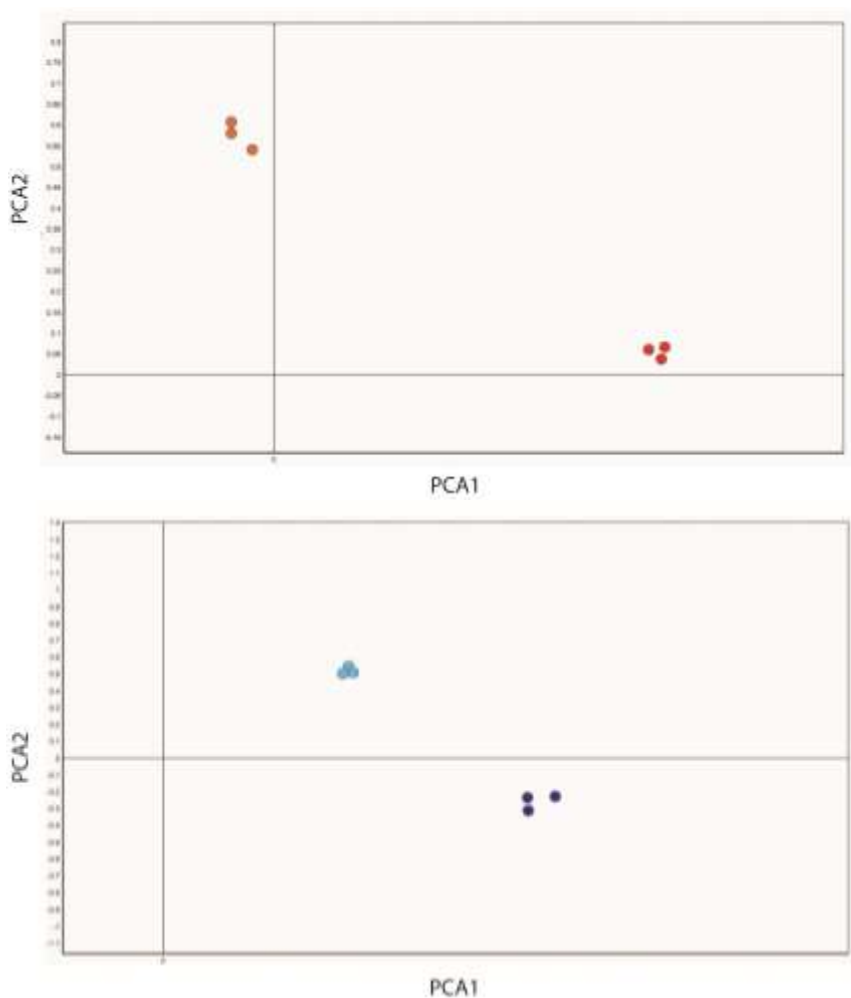
Gruppo sperimentale	Colore
E1KO	Red
C57	Yellow
flox-flox	Light Blue
wt	Dark Blue

**Tabella 5: Raggruppamento dei gel nei gruppi sperimentali.**

Nel modulo BVA del *software DeCyder* ad ogni gel è stato assegnato al proprio gruppo sperimentale. Ogni gruppo è contraddistinto da un colore: rosso per i topi Emilina-1 *knockout* e azzurro per topi Emilina-1 *knockout* condizionali indotti da Tamoxifen, arancione e blu per i rispettivi controlli.

### 7.2.1.1 Analisi statistica delle arterie mesenteriche

L'omogeneità delle repliche all'interno dei gruppi è stata confermata dall'analisi delle componenti principali (figura 22). Inoltre questa analisi ha messo in evidenza che la maggiore variabilità è presente tra il gruppo E1KO e il suo controllo, mentre il gruppo flox-flox ha un profilo di espressione più simile al wt.



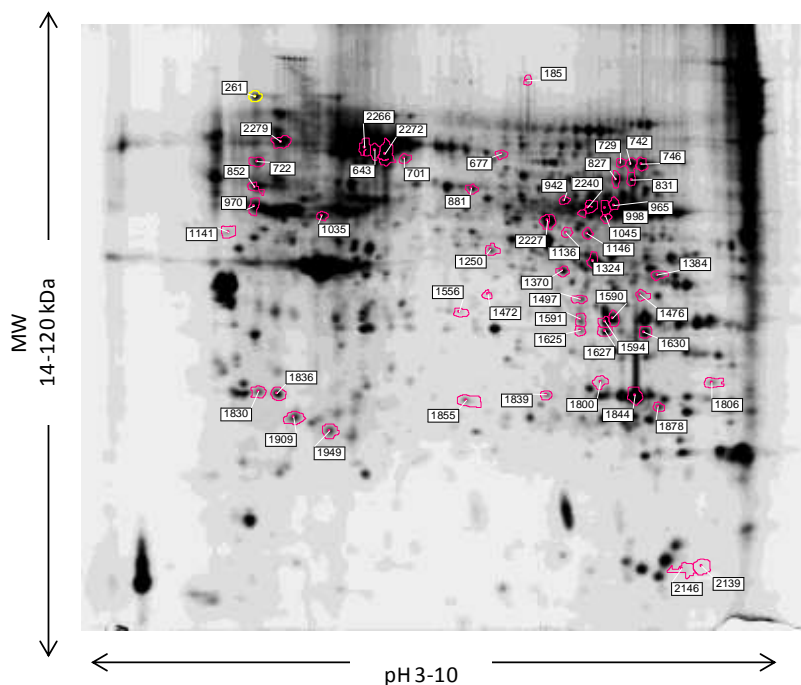
**Figura 22: PCA dei gruppi E1KO, C57, flox-flox e wt nell'analisi 2D-DIGE delle arterie mesenteriche.**

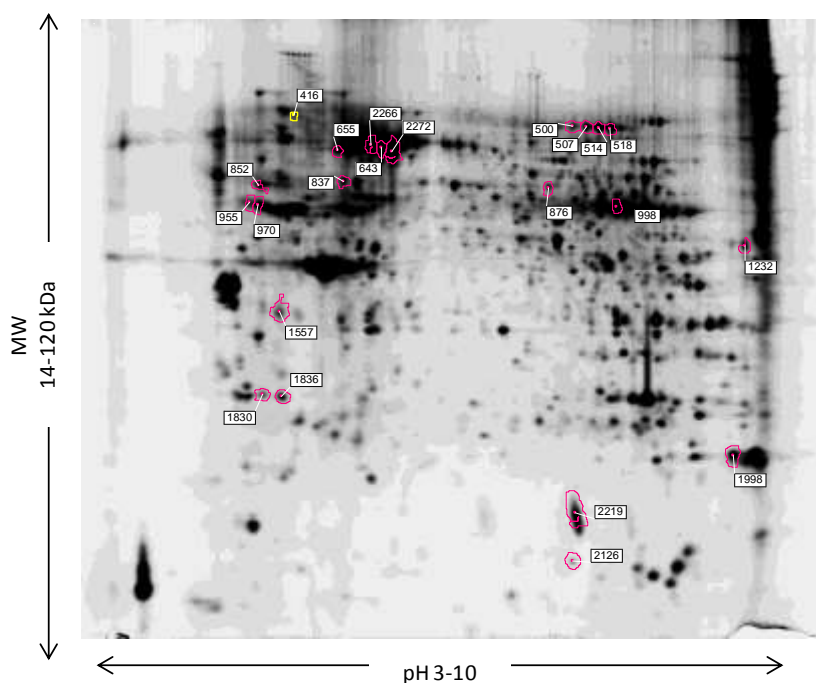
Analisi multivariata delle componenti principali delle tre repliche di ogni gruppo sperimentale.

I risultati della *Differential Expression Analysis* sono riassunti nella tabella 6. Le macchie differenzialmente espresse con *Student's T-test*  $< 0,01$  sono 53 nei topi E1KO e 22 nei topi flox-flox in relazione ai rispettivi controlli (figura 23). In entrambi i confronti la maggior parte delle proteine risulta meno espressa rispetto al controllo (33 nel confronto E1KO vs C57 e 17 nel confronto flox-flox vs wt), mentre poche proteine risultano maggiormente espresse (20 nel confronto E1KO vs C57 e 5 in quello flox-flox vs wt).

Confronto	N° macchie differenzialmente espresse	N° macchie down-regolate	N° macchie up-regolate
E1KO vs C57	53	33	20
flox-flox vs wt	22	17	5

**Tabella 6: Riassunto del numero di macchie differenzialmente espresse nelle arterie mesenteriche nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli.**





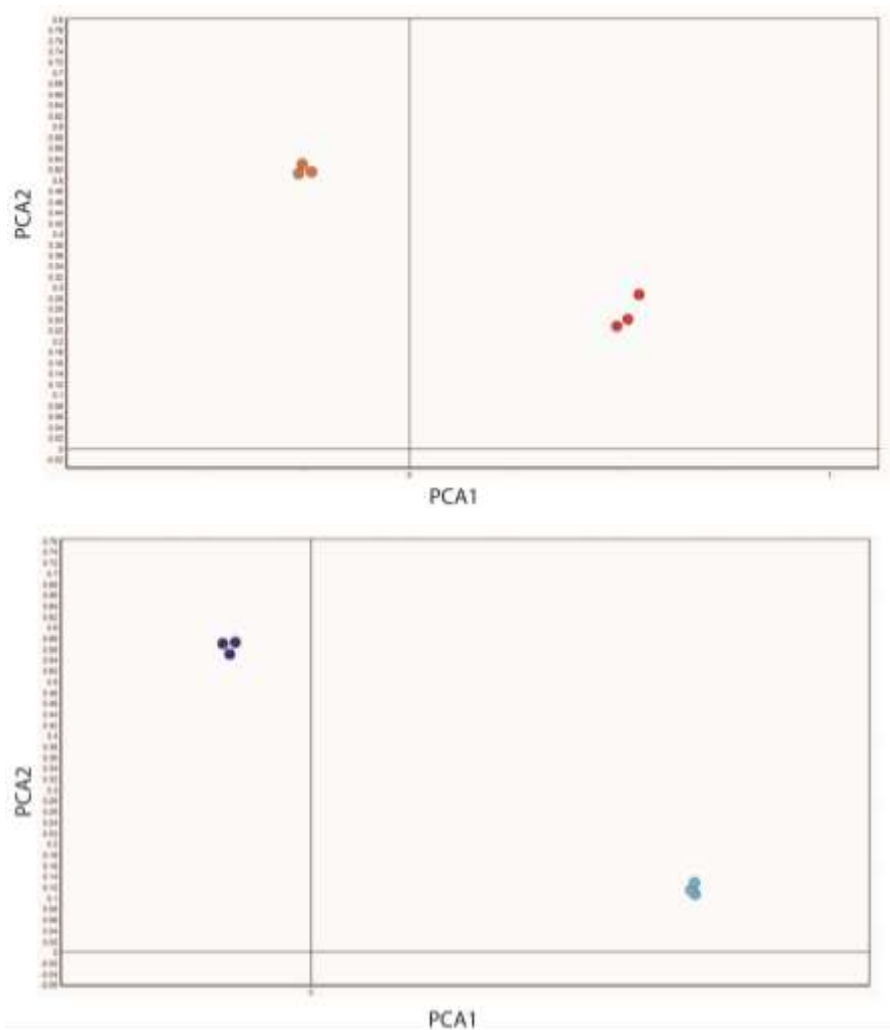
**Figura 23: Mappe 2D-DIGE delle arterie mesenteriche di topo E1KO e flox-flox.**

Le immagini mostrano le spot statisticamente variate nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli ( $T\text{-test} < 0,01$ ). Queste sono indicate con il numero di riferimento del *master gel*, ovvero quel gel che è rappresentativo di tutte le spot presenti nei gel dell'esperimento.

### **7.2.1.2 Analisi statistica dell'aorta**

L'analisi delle componenti principali ha messo in evidenza che le repliche all'interno dei gruppi sono omogenee tra loro e che i gruppi E1KO e flox-flox sono variati rispetto ai relativi controlli (figura 24).





**Figura 24: PCA dei gruppi E1KO, C57, flox-flox e wt nell'analisi 2D-DIGE di aorta.**

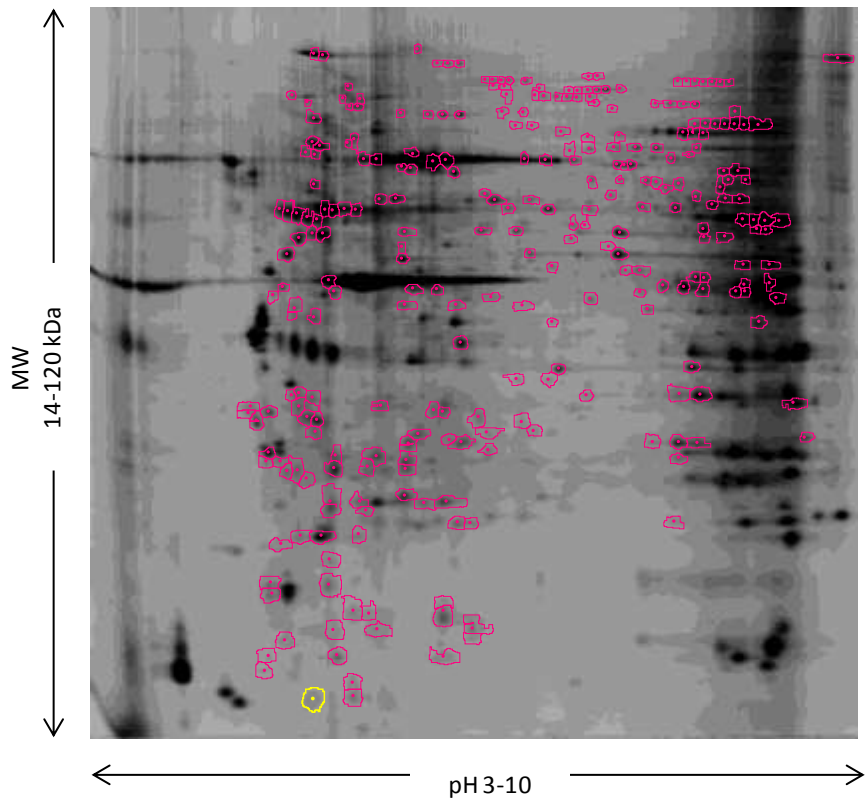
Analisi multivariata delle componenti principali delle tre repliche di ogni gruppo sperimentale.

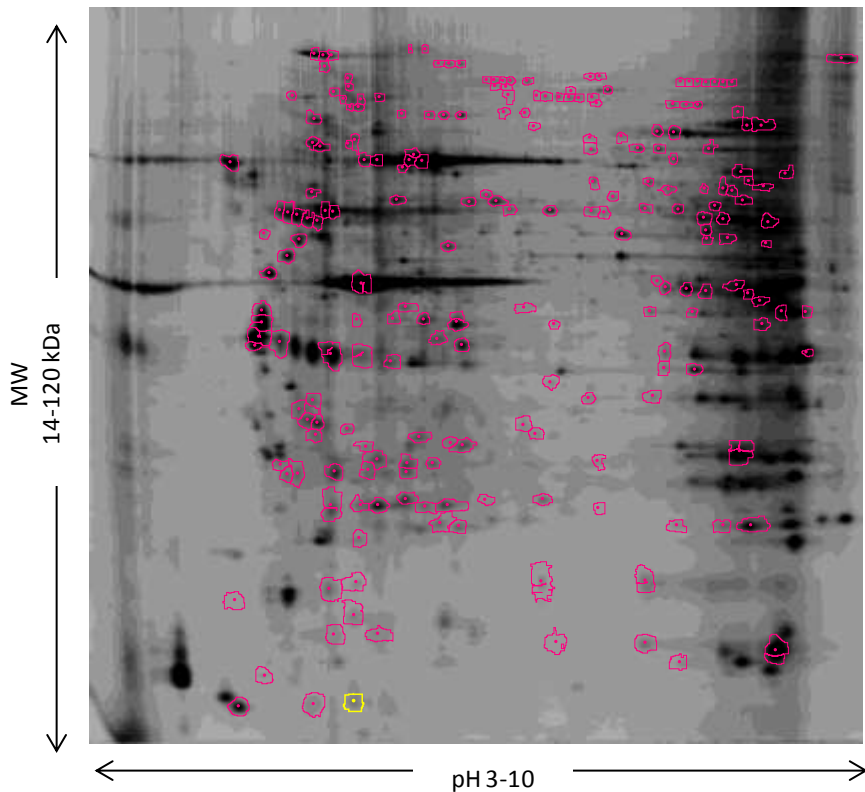
Mediante l'analisi differenziale sono state individuate 274 spot nei topi E1KO e 214 spot nei topi flox-flox, variate in modo significativo in relazione ai rispettivi controlli (figura 25 e tabella 7). Nel confronto E1KO vs C57 la maggior parte delle proteine variate (181) risulta down-regolata, mentre 93 proteine risultano up-regolate. Nel confronto flox-flox vs wt invece la

maggior parte delle proteine variate (129) risulta up-regolata, mentre 85 proteine risultano down-regolate.

Confronto	N° macchie differenzialmente espresse	N° macchie down-regolate	N° macchie up-regolate
E1KO vs C57	274	181	93
flox-flox vs wt	214	85	129

**Tabella 7: Riassunto del numero di macchie differenzialmente espresse nell’aorta nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli.**



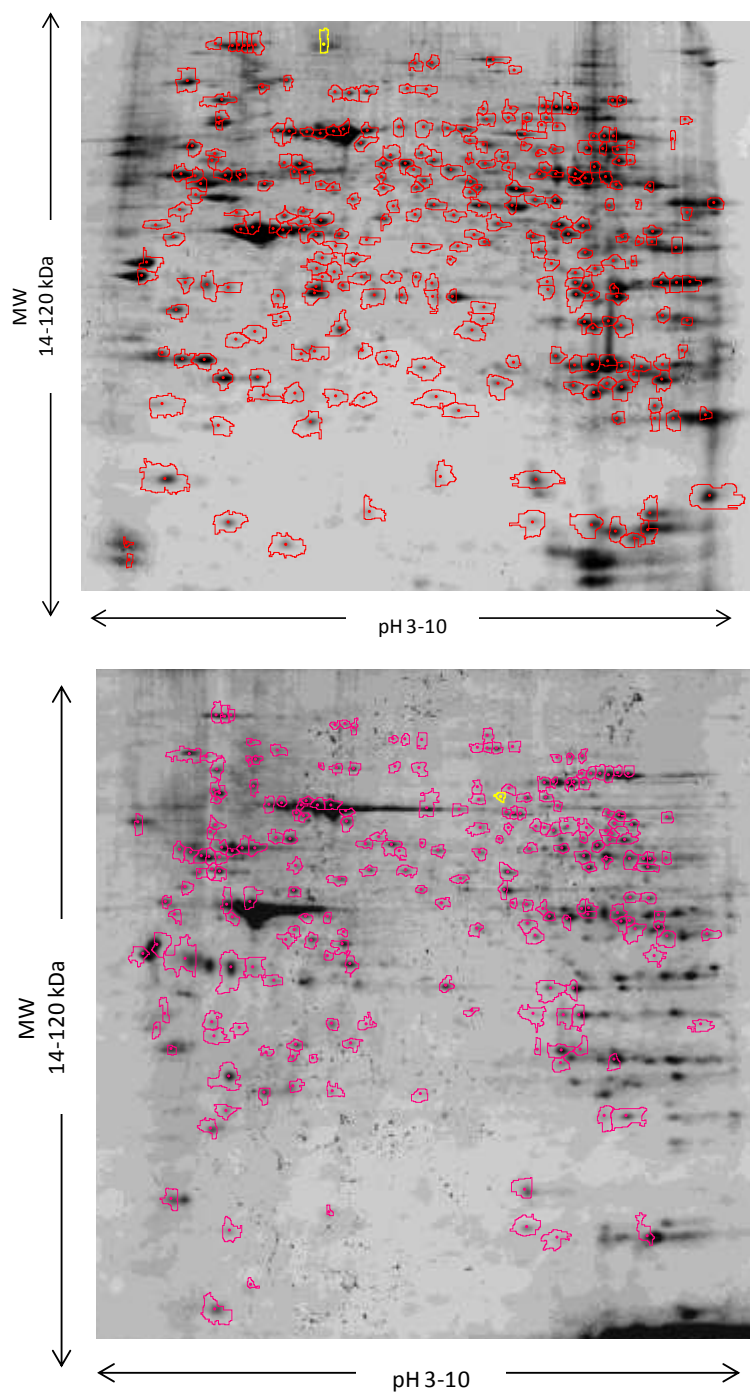


**Figura 25: Mappe 2D-DIGE dell'aorta di topo E1KO e flox-flox.**

Le immagini mostrano le spot statisticamente variate nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli (T-test < 0,01).

### 7.2.2 Identificazioni proteiche

Per l'identificazione delle macchie differenzialmente espresse sono stati allestiti dei gel preparativi. Da questi gel oltre alle POI (macchie proteiche d'interesse) sono state prelevate la maggior parte delle macchie visibili, in modo da ottenere una "mappa *standard*" delle arterie mesenteriche e dell'aorta di topo. Come campione è stata perciò utilizzata una miscela di tutti gli estratti proteici dei gruppi sperimentali per ogni tessuto (figura 26).



**Figura 26: Mappe preparative di arterie mesenteriche e aorta di topo.**

Per visualizzare le macchie proteiche è stato utilizzato il colorante fluorescente *Lava Purple*.

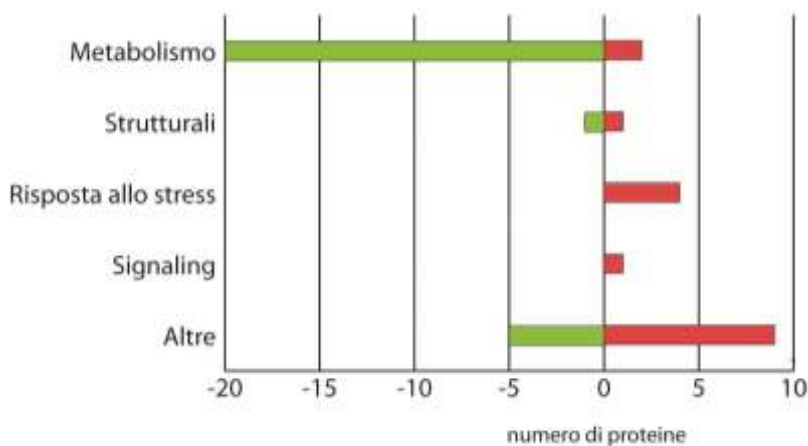
Le proteine sono state poi identificate mediante spettrometria di massa MALDI Tof-Tof e suddivise in classi in base alla loro funzione cellulare. Le classi funzionali utilizzate sono: metabolismo cellulare, biosintesi proteica, proteine contrattili e citoscheletriche, adesione cellulare, proteine coinvolte nella risposta allo stress, nel *signaling* e altre. Il numero di proteine identificate per ogni classe e il loro andamento sono stati visualizzati con l'uso di istogrammi.

#### **7.2.2.1 Identificazioni proteiche delle arterie mesenteriche**

Delle proteine differenzialmente espresse nelle mappe di arterie mesenteriche, 41 proteine sono state identificate nel confronto E1KO vs C57 e 16 nel confronto flox-flox vs wt (tabella appendice 1 – 3).

##### Confronto E1KO vs C57

Nelle arterie mesenteriche del modello E1KO, si nota una generale diminuzione delle proteine metaboliche e delle proteine di trasporto plasmatiche (figura 27). Al contrario le proteine coinvolte nella risposta allo stress del reticolo endoplasmatico risultano aumentate. Si verifica anche un incremento di alcune proteine proteolitiche rilasciate nel flusso sanguigno da altri organi.



**Figura 27: Profilo proteomico delle arterie mesenteriche dei topi E1KO mediante 2D-DIGE.**

Istogrammi delle proteine identificate significativamente variare (T-test < 0,01 e *Av. Ratio* < -1,2 e > 1,2) nei topi E1KO rispetto al controllo (C57), suddivise in base alle classi funzionali di appartenenza.

In particolare, a livello metabolico si ha una diminuzione della *phosphoglycerate mutasi 1* (PGAM1), una proteina della glicolisi, e delle proteine coinvolte nella trasformazione del piruvato in acetyl-CoA, lattato e ossalacetato (*pyruvate dehydrogenase* - PDHA1, DLAT, *lactate dehydrogenase* - LDHA, *pyruvate carboxilase* - PC) (figura 28). Risultano diminuite anche alcune proteine coinvolte nel metabolismo degli aminoacidi, come l'*amino acid aminotransferase* (BCAT2), la *3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase* (HIBCH), l'*indolethylamine N-methyltransferase* (INMT), l'*isovaleryl-CoA dehydrogenase* (IVD), e degli zuccheri, tra cui la *transketolase* (TKT) e l'*aldose reductase* (AKR1B1).

Nella classe delle proteine strutturali è stata trovata aumentata una proteina dei filamenti intermedi, la *desmin* (DES), con un *Av. ratio* di 1,3.

Un incremento dell'espressione proteica è stato riscontrato anche nelle proteine di risposta allo stress del reticolo endoplasmatico, come l'isoforma

A2 della *disulfide isomerase* (PDIA2), che presenta un *Av. ratio* di 3.72, e nella *rho-GDP inhibitor* (ARHGDIA), una proteina di segnale che regola lo scambio GDP/GTP delle *Rho protein*.

Tra le altre proteine aumentate vi sono la *pancreatic alpha-amylase* (AMY2), la *pancreatic triacylglycerol lipase* (PNLIP), il *chymotrypsinogen B* (CTRB1) e il *trypsinogen 7* (TRY), proteine coinvolte nella degradazione dei carboidrati e degli acidi grassi a livello intestinale. Infine nelle arterie mesenteriche si verifica anche una diminuzione dell'*apolipoprotein A-I* (APOA1), una molecola associata al corretto funzionamento delle lipoproteine ad alta densità (HDL) che sono responsabili della rimozione del colesterolo in eccesso dai tessuti periferici e del suo trasporto al fegato o ai tessuti steroideogenici, come le ghiandole surrenali o le gonadi.

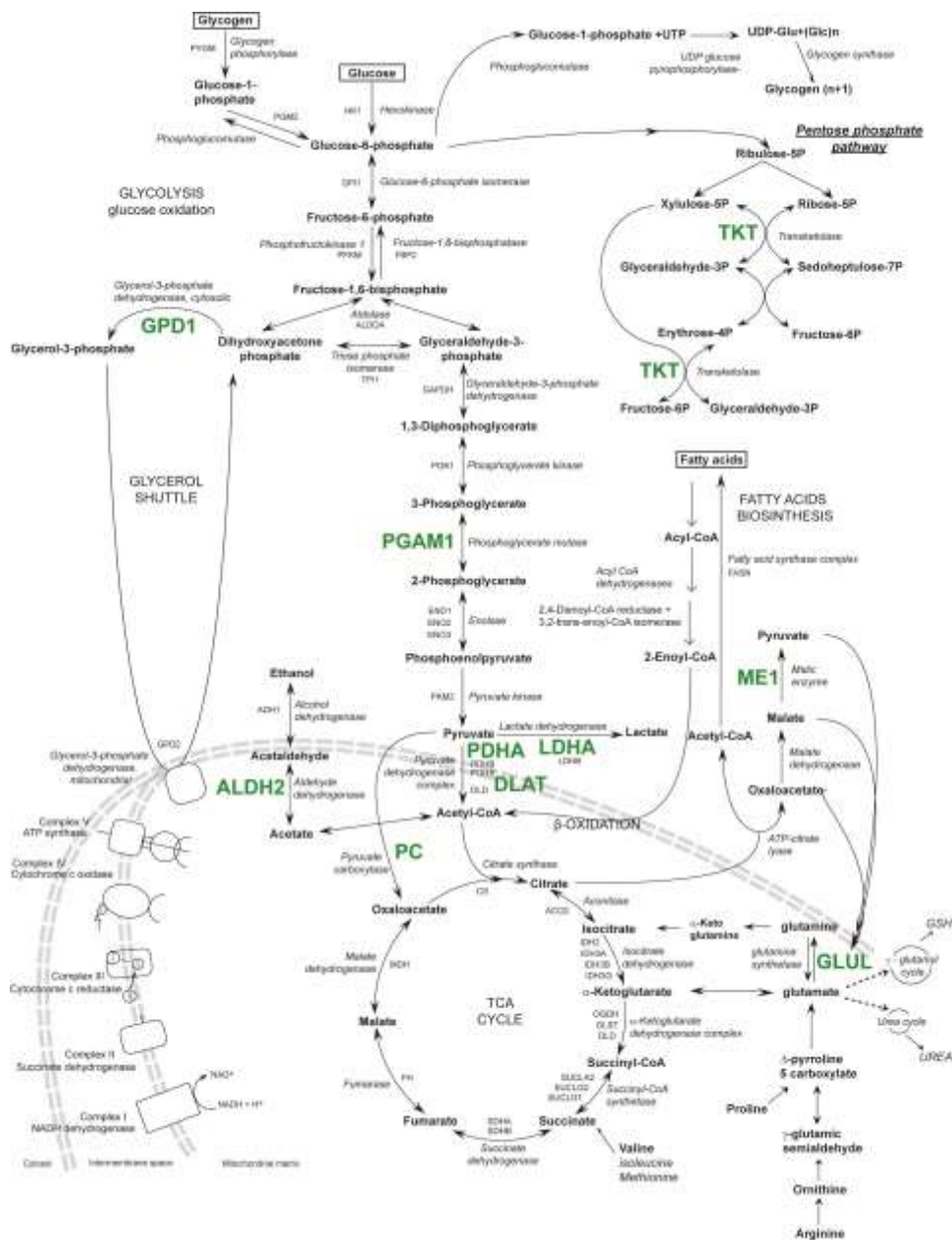
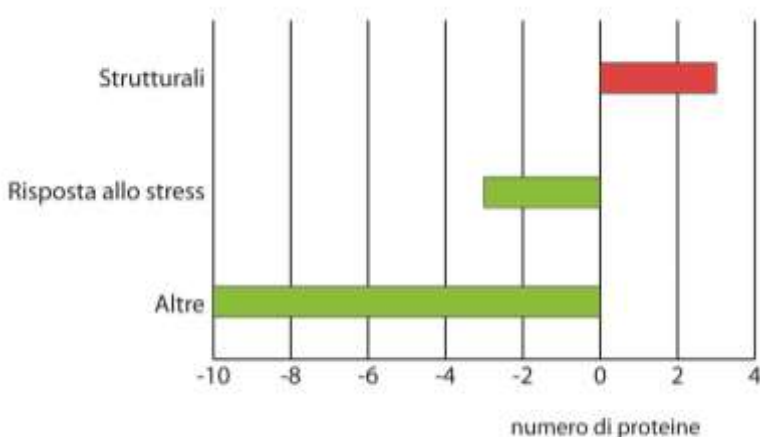


Figura 28: Schema delle variazioni metaboliche nelle arterie mesenteriche del modello E1KO.



### Confronto flox-flox vs wt

Nei topi flox-flox trattati con Tamoxifen non sono state riscontrate variazioni del metabolismo cellulare; risultano invece aumentate alcune proteine strutturali regolatorie e, contrariamente ai topi E1KO, si verifica una diminuzione delle proteine di risposta allo stress e proteolitiche nel sangue (figura 29).



**Figura 29: Profilo proteomico delle arterie mesenteriche dei topi flox-flox mediante 2D-DIGE.**

Istogrammi delle proteine identificate significativamente variare (T-test < 0,01 e Av. Ratio < -1,2 e > 1,2) nei topi flox-flox rispetto al controllo (wt), suddivise in base alle classi funzionali di appartenenza.

Nel complesso il modello flox-flox, presenta minori variazioni rispetto al modello E1KO. Tra le proteine strutturali è interessante notare l'incremento, con un Av. ratio di 1,23, della *transgelin* (SM22 $\alpha$ ), un marcatore del fenotipo contrattile delle SMC.

Sono state identificate anche tre proteine diminuite coinvolte nella risposta allo stress, l'*Hspa8 protein* (HSPA8), la *60 kDa heat shock protein* (HSPD1) e la *protein disulfide-isomerase* (PDIA).

In questo modello, la *pancreatic alpha-amylase* (AMY2) e il

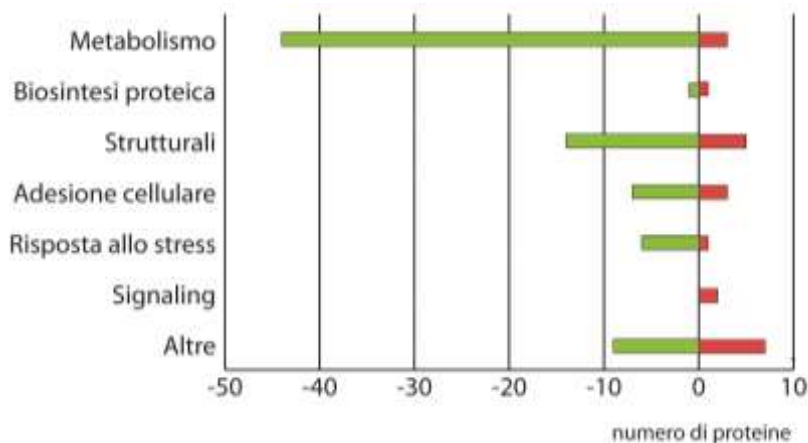
*chymotrypsinogen B* (CTRB1) risultano fortemente diminuiti con un'entità di variazione proteica, in termini di Av. ratio, pari a -3.

### 7.2.2.2 Identificazioni proteiche dell'aorta

Tra le proteine variate significativamente nelle mappe di aorta, 103 proteine sono state identificate nel confronto E1KO vs C57 e 80 nel confronto flox-flox vs wt (tabelle appendice 4 – 7).

#### Confronto E1KO vs C57

Nell'aorta dei topi E1KO rispetto ai relativi controlli si nota una generale down-regolazione delle proteine cellulari (figura 30). In particolare vi è una minore espressione della maggior parte delle proteine del metabolismo cellulare, strutturali, coinvolte nell'adesione e nella risposta allo stress. Solo alcune proteine responsabili del *signaling* risultano principalmente aumentate. Altre variazioni sono state riscontrate a livello della biosintesi proteica ed in altre proteine cellulari.



**Figura 30: Profilo proteomico dell'aorta dei topi E1KO mediante 2D-DIGE.**

Istogrammi delle proteine identificate significativamente variate (T-test < 0,01 e Av. Ratio < -1,2 e > 1,2) nei topi E1KO rispetto al controllo (C57), suddivise in base alle classi funzionali di appartenenza.

La figura 31 mostra le variazioni metaboliche del modello E1KO, che interessano principalmente: la glicolisi, il ciclo di Krebs, il metabolismo del piruvato e la catena respiratoria. Tra le proteine diminuite vi sono due enzimi della glicolisi, l'*Eno1 protein* (ENO1) e la *pyruvate kinase* (PKM2), alcune proteine che catalizzano quattro passaggi del ciclo di Krebs (*aconitase* - ACO2,  *$\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex* - OGDH, DLST e DLD, *fumarase* - FH, *malate dehydrogenase* - MDH) ed altre coinvolte nella trasformazione del piruvato in acetil-CoA e ossalacetato (*pyruvate dehydrogenase* - PDHA1 e *pyruvate carboxylase* - PC), queste ultime presentano lo stesso andamento anche nelle arterie mesenteriche. Nella catena respiratoria, vi è una diminuzione delle proteine del complesso I, III e V. Tra gli altri processi metabolici che presentano proteine differenzialmente espresse vi sono la  $\beta$ -ossidazione (figura 32), il metabolismo dei lipidi, degli aminoacidi e del retinolo, il catabolismo degli xenobiotici e i processi che portano alla sulfonilazione dei proteoglicani. Tra le proteine coinvolte in questi processi è interessante notare un incremento della *retinol-binding protein 1* (RBP1) con *Av. ratio* 2,96, il trasportatore intracellulare del retinolo, che è un *marker* di attivazione delle SMC in seguito ad una lesione dell'endotelio [74], l'aumento della *Cryz protein* (NQO1) che attiva un meccanismo di riduzione della pressione arteriosa mediato da eNOS [75] e l'over-espressione della *bisphosphate 3'-nucleotidase* (BPNT1), che è implicata nelle reazioni che determinano la sulfonilazione dei proteoglicani, un processo necessario per il mantenimento della struttura dell'ECM [50].

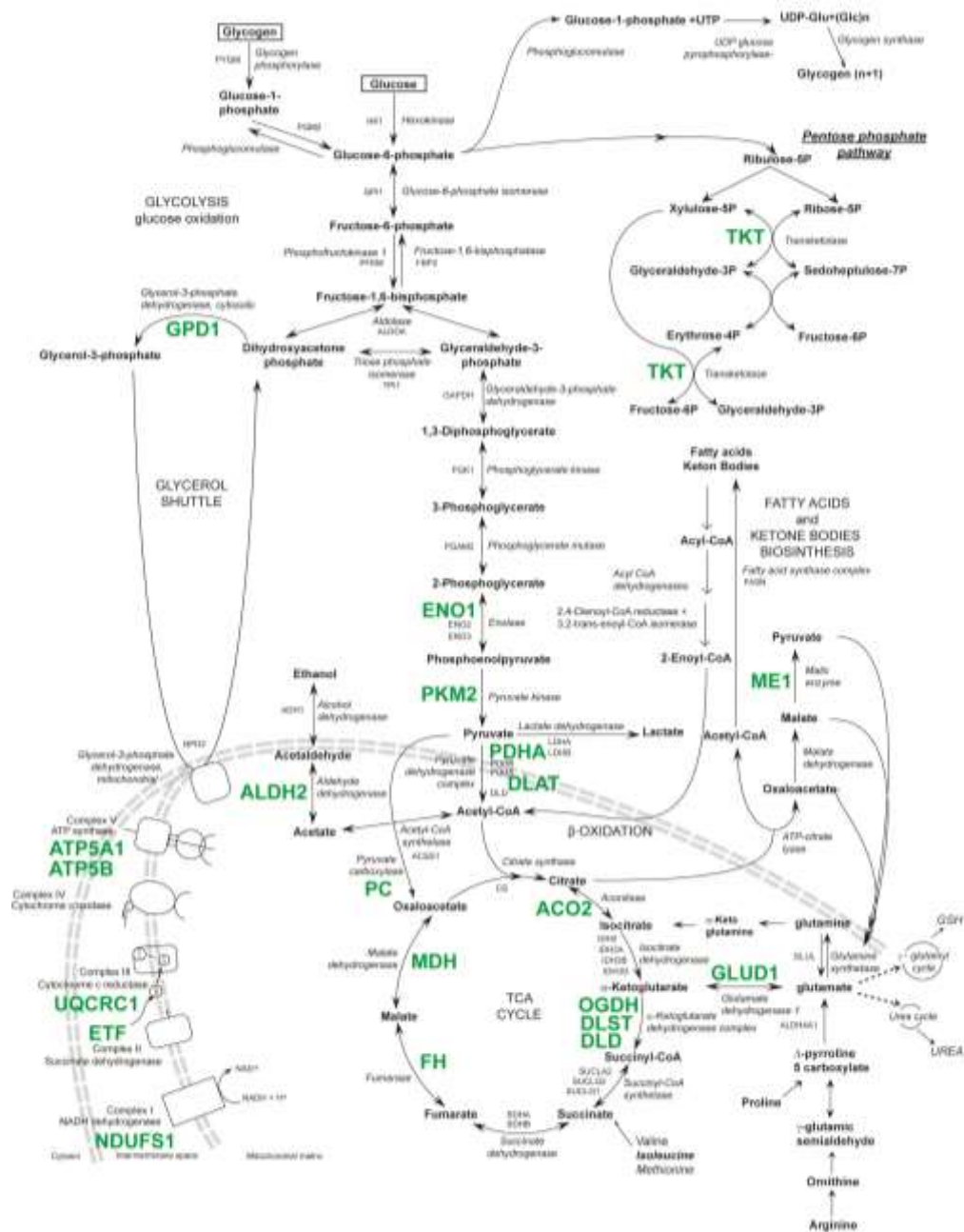


Figura 31: Schema delle variazioni metaboliche nell'aorta del modello E1KO.

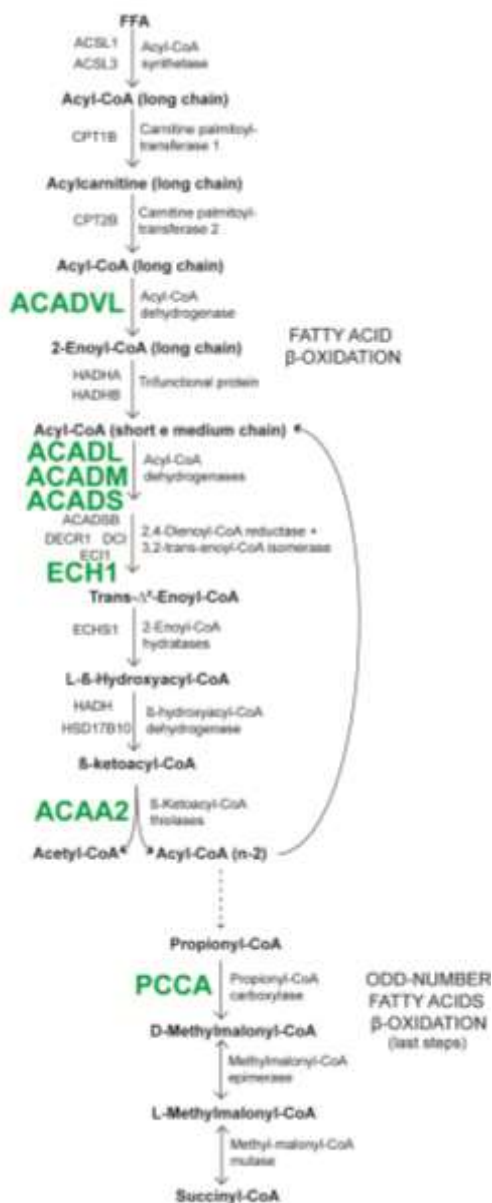


Figura 32: Schema delle variazioni proteiche della  $\beta$ -ossidazione nell'aorta del modello E1KO.

Per quanto riguarda la biosintesi proteica, un'isoforma dell'*elongation factor Tu* (TUFM) è down-regolata, mentre l'*eukaryotic translation initiation factor*

5A (EIF5A) risulta aumentato con un *Av. ratio* di 2,74.

Le proteine strutturali sono principalmente down-regolate (figura 33), tra queste vi sono alcune proteine dei filamenti intermedi (due isoforme della *lamin-A/C* - LMNA/C e la *vimentin* - VIM), due isoforme della *tubulin* (TBB5 e TBB2C), che costituisce i microtubuli, e la *myosin*, responsabile della contrazione cellulare. Le proteine associate alla regolazione dei filamenti actinici risultano invece aumentate, tra cui la *capping protein* (CAPZB), che previene l'assemblamento o il disassemblamento dei filamenti di actina e un'isoforma della *tropomyosin* (TPM3), che li stabilizza. Anche in questo modello la *transgelin* (SM22 $\alpha$ ), un marcatore del fenotipo contrattile delle SMC, risulta aumentato.

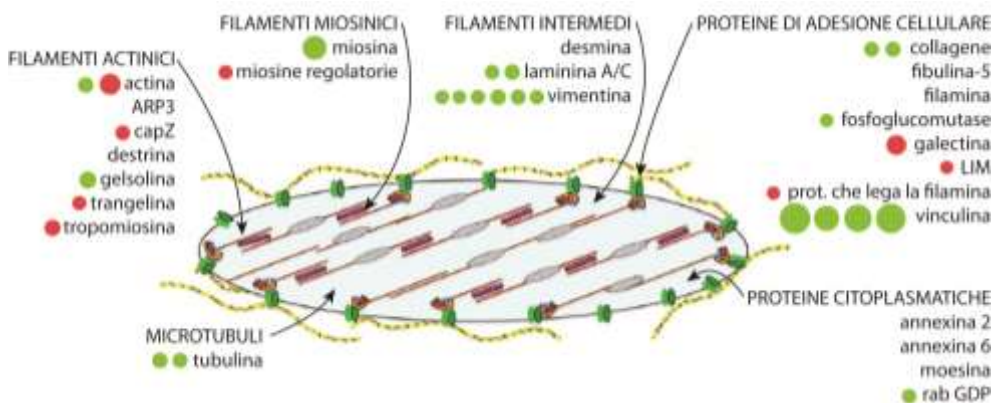
Delle proteine responsabili dell'adesione cellulare, che collegano il citoscheletro alla membrana cellulare o fanno parte dell'ECM, sono state riscontrate variazioni in quattro isoforme della *vinculin* (VCL), con un *Av. ratio* medio di -5, un incremento di un isoforma della *LIM protein* (FHL1) e della *filamin-binding LIM protein 1* (FBLIM1), che funge da sito di legame per le proteine che ancorano la cellula all'ECM e contribuisce alla stabilizzazione dei filamenti di actina. A livello dell'ECM si nota una riduzione del *collagen alpha-1(VI) chain* (COL6A1) e della *phosphoglucomutase-like protein 5* (PGM5), che è un componente delle giunzioni cellula-cellula e cellula-ECM ed è solitamente espressa ad alti livelli nelle SMC [76]. Mentre si verifica un incremento della *galectin-1* (LGALS1) che è implicata nella modulazione delle interazioni cellula-cellula e cellula-ECM. Questa proteina regola le funzioni delle SMC attraverso l'internalizzazione del canale per il calcio CaV1.2, determinando un decremento del tono vasale [77].

Una diminuzione dell'espressione proteica interessa anche le proteine di risposta allo stress, come alcune *heat shock protein* e un'isoforma della *protein disulfide-isomerase* (PDIA3), solo la *peroxiredoxin-2* (PRDX2)

risulta aumentata.

In questo modello risultano alterate anche alcune proteine coinvolte nel *signaling* cellulare: la *14-3-3 protein epsilon* (YWHAE), che è associata alla sopravvivenza delle EC e coinvolta nel rimodellamento dei filamenti di actina, e la *14-3-3 zeta* (YWHAZ).

Tra le altre proteine alterate di interesse vi è l'*annexin A6* (ANXA6) che è implicata nell'esocitosi, nel traffico di membrana e nel *signaling* del  $\text{Ca}^{2+}$ , essa inoltre partecipa al rimodellamento del citoscheletro e della membrana plasmatica favorendo la formazione di vescicole rivestite di clatrina [78-80].



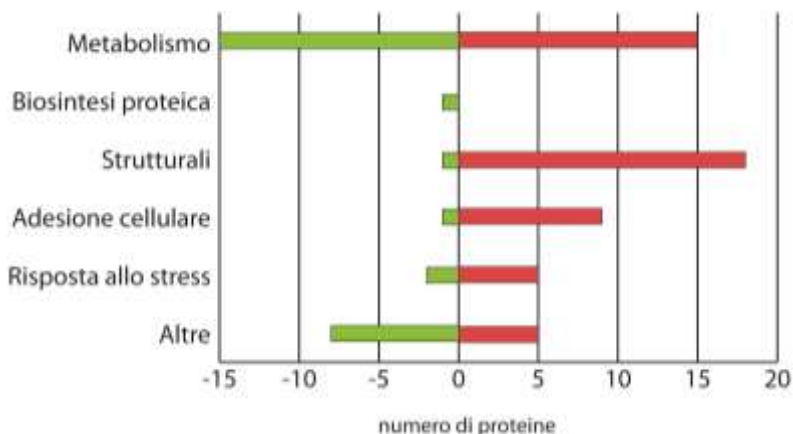
**Figura 33: Alterazioni proteiche identificate mediante 2D-DIGE a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello E1KO.**

Lo schema mostra la struttura di una SMC in cui sono indicate le proteine differenzialmente espresse del citoscheletro e dell'ECM. L'intensità della variazione è rappresentata mediante pallini: il colore rosso o verde indicano rispettivamente se la proteina è aumentata o diminuita, la grandezza è direttamente proporzionale all'intensità della variazione (*Av. ratio*), il numero specifica quante isoforme o proteine della stessa famiglia sono state identificate.

### Confronto flox-flox vs wt

L'aorta del modello flox-flox presenta un incremento di gran parte delle proteine cellulari (figura 34). La maggior parte delle proteine metaboliche,

strutturali, coinvolte nell'adesione cellulare e nella risposta allo stress risultano infatti up-regolate.



**Figura 34: Profilo proteomico dell'aorta dei topi flox-flox mediante 2D-DIGE.**

Istogrammi delle proteine identificate significativamente variare (T-test < 0,01 e Av. Ratio < -1,2 e > 1,2) nei topi flox-flox rispetto al controllo (wt), suddivise in base alle classi funzionali di appartenenza.

In questo modello, come nei topi E1KO, le principali alterazioni metaboliche si verificano a livello della glicolisi, del ciclo di Krebs e del metabolismo del piruvato, in parte con andamento opposto (figura 35). Tra le proteine della glicolisi la *pyruvate kinase* (PKM2) risulta aumentata, come due proteine che catalizzano alcuni passaggi del ciclo di Krebs (*aconitase* - ACO2, *α-ketoglutarate dehydrogenase complex* - DLD) e la *pyruvate carboxylase* (PC) che determina la trasformazione del piruvato in ossalacetato. Sono up-regolate anche due proteine coinvolte nel destino del glutammato, la *glutamate dehydrogenase 1* (GLUD1) e la *delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase* (ALDH4A1). La figura 36 mostra invece la β-ossidazione degli acidi grassi, che resta ancora prevalentemente down-regolata. Tra le proteine metaboliche coinvolte in meccanismi associati all'ipertensione



arteriosa, la proteina *Cryz* (NQO1) nei topi flox-flox è stata trovata diminuita.

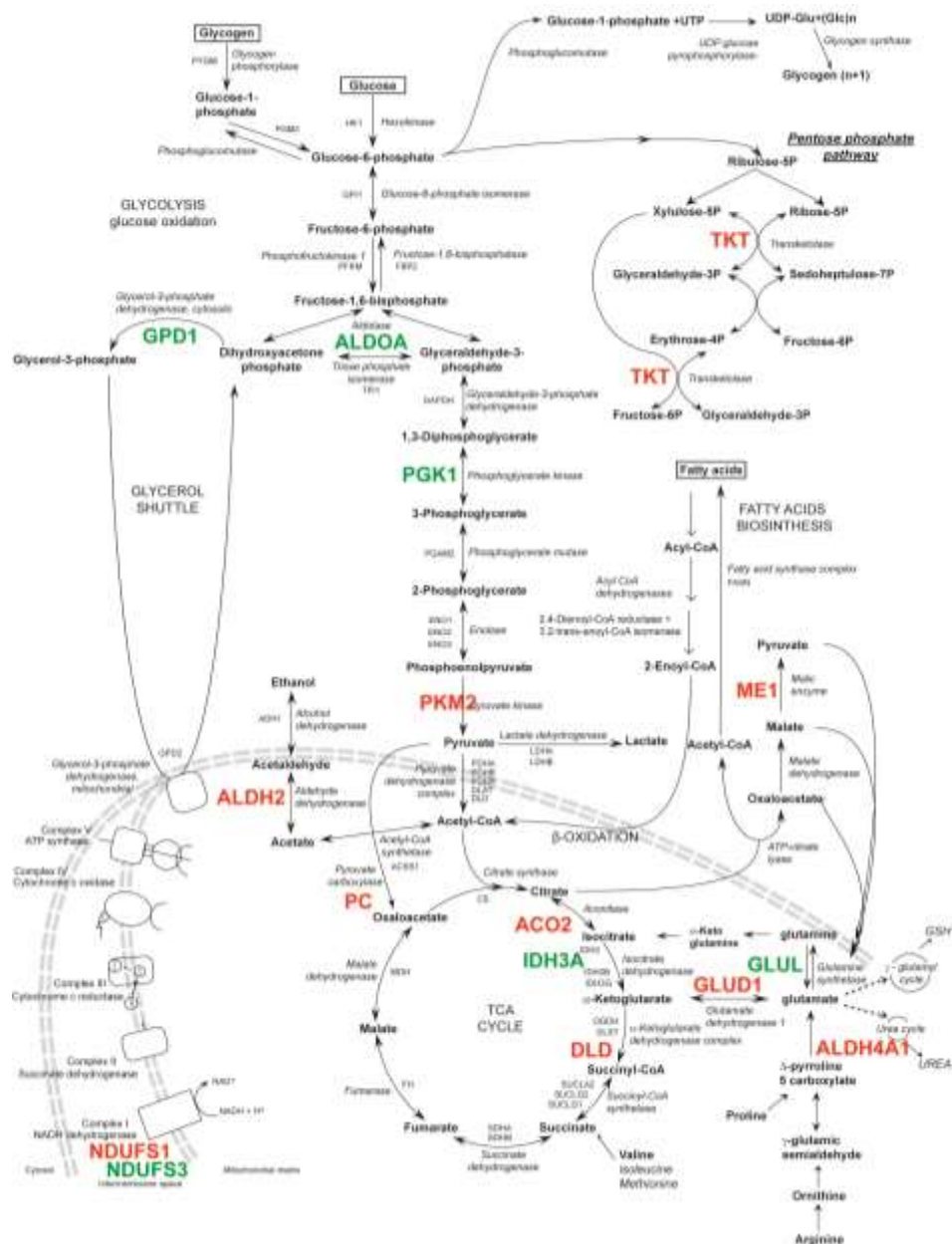


Figura 35: Schema delle variazioni metaboliche nell'aorta del modello flox-flox.

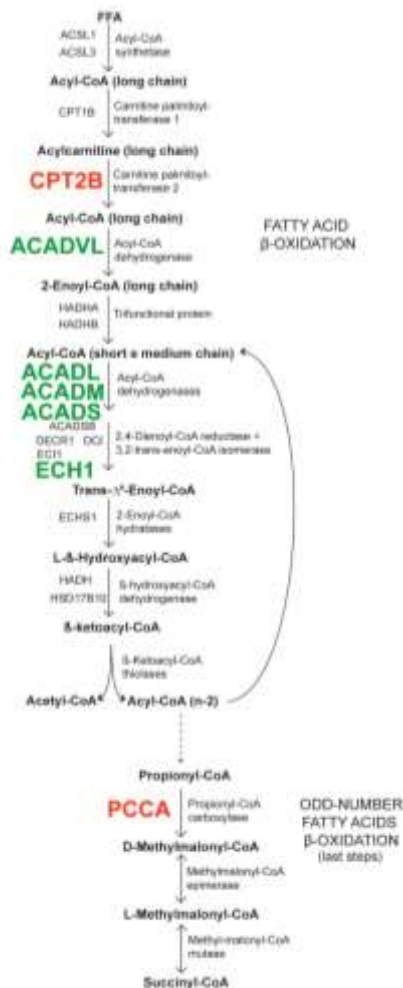
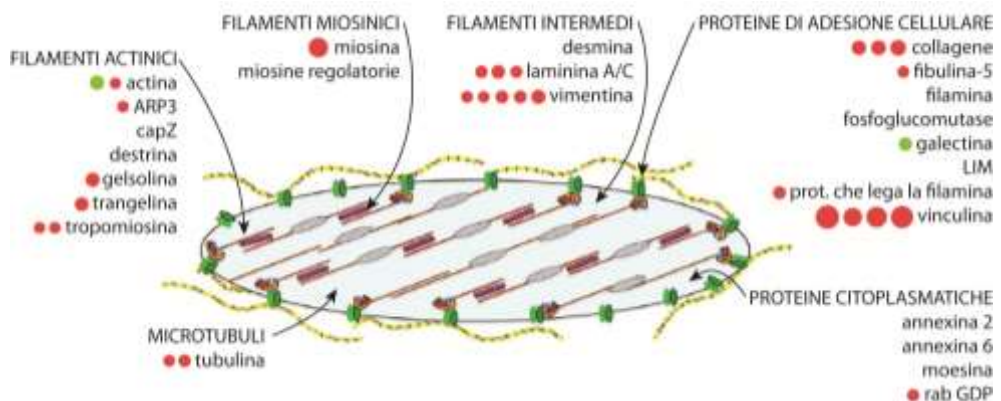


Figura 36: Schema delle variazioni proteiche della β-ossidazione nell'aorta del modello flox-flox.

Nell'aorta del modello flox-flox, a differenza dei topi E1KO, le proteine strutturali risultano aumentate (figura 37), tranne la *smooth muscle gamma-actin* (ACTG2) che presenta una variazione in termini di *Av. ratio* pari a -1,9. L'incremento dell'espressione proteica interessa alcune proteine dei filamenti intermedi (due isoforme della *lamin-A/C* – LMNA/C e la *vimentin* -

VIM), dei microtubuli (*tubulin* – TBB2C) e del sarcomero (*myosin* - MYH). A queste si aggiungono le proteine associate alla regolazione dei filamenti di actina come un'isoforma della *tropomyosin* (TPM2), la *gelsolin* (GSN), che ne controlla la polimerizzazione [81], e l'*actin-related protein 3* (ARP3), che favorisce la formazione di diramazioni. Anche in questo modello troviamo aumentata la *transgelin* (SM22 $\alpha$ ), con un *Av. ratio* di 1,74.

Le proteine responsabili dell'adesione cellulare in questo modello risultano aumentate, tra queste vi sono quattro isoforme della *vinculin* (VCL), con un *Av. ratio* medio di 4, la *fibulina-5* (FBLN5), una componente dell'ECM che lega Emilina-1 e necessaria per l'assemblamento delle fibre di elastina. La *galectin-1* (LGALS1) nell'aorta dei topi flox-flox diminuisce invece la sua espressione.



**Figura 37: Alterazioni proteiche identificate mediante 2D-DIGE a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello flox-flox.**

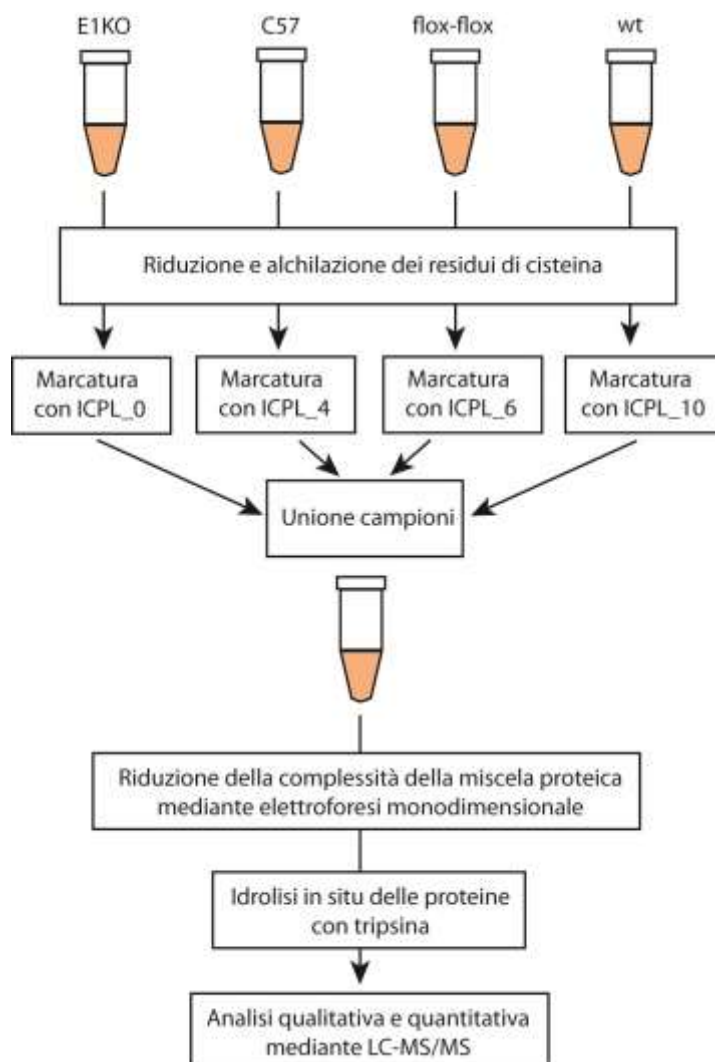
Lo schema mostra la struttura di una SMC in cui sono indicate le proteine differenzialmente espresse del citoscheletro e dell'ECM. L'intensità della variazione è rappresentata mediante pallini: il colore rosso o verde indicano rispettivamente se la proteina è aumentata o diminuita, la grandezza è direttamente proporzionale all'intensità della variazione (*Av. ratio*), il numero specifica quante isoforme o proteine della stessa famiglia sono state identificate.

Contrariamente al modello E1KO, nei topi flox-flox anche alcune proteine coinvolte nella risposta allo stress sono aumentate, come *heat shock protein HSP 90-beta* e l'isoforma A3 della *protein disulfide-isomerase* (PDIA3). Mentre due proteine appartenenti a questa classe (la *stress-70 protein* - HSPA9 e la *peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A* - PPA) diminuiscono la loro espressione.

Tra le altre proteine di interesse vi sono l'*apolipoprotein A-I* (APOA1) e *chloride intracellular channel protein 1* (CLIC1), un canale per il cloro che è associato alla migrazione delle EC [82].

### **7.3 Analisi proteomica ICPL dell'aorta**

Per superare le limitazioni intrinseche delle metodologie basate sull'elettroforesi (scarsa risoluzione delle proteine idrofobiche, perdita delle proteine ad alto e basso peso molecolare dipendente dalla densità del gel [83] si è adottato un approccio di spettrometria di massa quantitativa: il SILE-LC-MS. I campioni sono stati marcati sfruttando la tecnologia ICPL. Il kit permette di quantificare quattro differenti campioni nello stesso esperimento: gli estratti proteici sono stati marcati con diversi reagenti isotopici, uniti e separati in base al loro peso molecolare mediante elettroforesi monodimensionale, al fine di ridurre la complessità. Per la quantificazione proteica e la relativa identificazione, le frazioni ottenute sono state digerite con tripsina, i peptidi separati mediante cromatografia in fase liquida e analizzati tramite ESI MS/MS (figura 38).



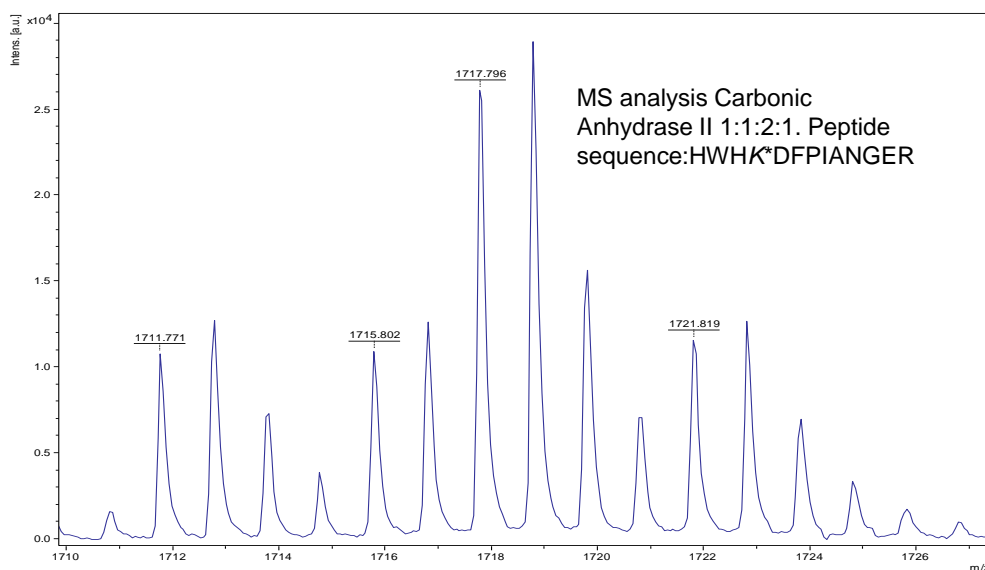
**Figura 38: Step sperimentali dell'analisi proteomica mediante tecnologia ICPL eseguita sui campioni di aorta dei topi E1KO, C57, flox-flox e wt.**

### 7.3.1 Controllo dell'efficienza della marcatura

Per confermare che la marcatura dei campioni sia avvenuta correttamente il *Kit ICPL (SERVA)* fornisce quattro miscele proteiche (*Protein Mix*), contenenti proteine standard, da marcare singolarmente con un diverso reagente isotopico in contemporanea con i campioni. Le *Protein Mix*

marcate sono state unite, idrolizzate ed i peptidi analizzati mediante spettrometria di massa MALDI ToF-ToF.

Ogni Protein Mix contiene tre proteine (la *BSA*, l'*Ovalbumin* e la *Carbonic Anhydrase II*) in proporzioni differenti secondo la tabella 4. La figura 39 mostra lo spettro di massa di un peptide della *Carbonic Anhydrase II*. In questo spettro è possibile distinguere quattro picchi distanziati dal primo di 4, 6 e 10 Da; essi rappresentano lo stesso peptide marcato con un differente isotopo ICPL a seconda della Protein Mix di partenza. L'intensità di ogni picco è rappresentativa dell'abbondanza relativa della proteina nel campione iniziale, che in questo caso è 1:1:2:1 (12 ug per il campione marcato con ICPL\_0, 12 ug per ICPL\_4, 24 ug per ICPL\_6 e 12 ug per ICPL\_10) (tabella 8). Nello spettro questa proporzione viene mantenuta, indicando che la marcatura è avvenuta correttamente.



**Figura 39: Spettro di massa di un peptide della *Carbonic Anhydrase II* identificato dalla miscela di quattro Protein Mix marcate con i quattro reagenti isotopici ICPL.**

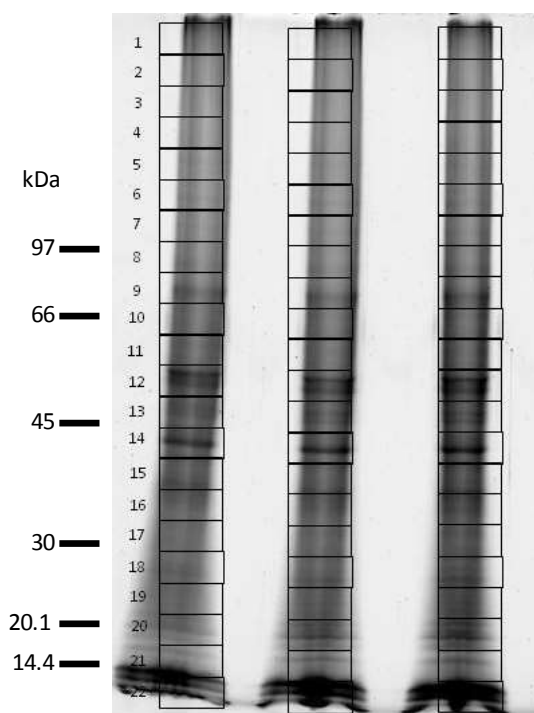
I picchi dei quattro peptidi risultano distanziati dal primo di 4, 6 e 10 Da, differenza corrispondente al cambiamento di massa molecolare tra i quattro reagenti isotopici.

Proteina	Protein Mix per ICPL_0	Protein Mix per ICPL_4	Protein Mix per ICPL_6	Protein Mix per ICPL_10	Abbondanza relativa
Carbonic Anhydrase II (bovine)	12 µg	12 µg	24 µg	12 µg	1:1:2:1

**Tabella 8: Abbondanza relativa della Carbonic Anhydrase II nelle Protein Mix per ICPL (SERVA).**

### 7.3.2 Analisi ICPL dell'aorta

Al fine di ridurre la complessità della miscela proteica dei campioni marcati, è stata eseguita un'elettroforesi monodimensionale. Ogni lane è stata suddivisa in 22 bande (figura 40), ogni banda idrolizzata ed analizzata mediante LC-ESI MS/MS.



**Figura 40: Gel monodimensionale per ridurre la complessità della miscela dei campioni marcati con ICPL.**

Mediante il software *ProteinScape*, le proteine di ogni lane sono state identificate ed è stata calcolata l'entità della variazione proteica (*ratio*  $\frac{ICPL_6}{ICPL_0}$  e  $\frac{ICPL_{10}}{ICPL_4}$ ): il software calcola la mediana dell'intensità dei picchi dei peptidi di ogni proteina per ciascuna marcatura ICPL, restituendo il *ratio* tra le mediane di ogni confronto. I risultati ottenuti per ogni lane sono stati confrontati manualmente mediante *Excel (Microsoft Office)* con quelli delle altre lane. Solo le proteine con una misura quantitativa dell'entità della variazione proteica maggiore di 1,5 o minore di -1,5 (*ratio* mediane  $< 0,66$  e  $> 1,5^1$ ), con almeno due peptidi diversi in due dei tre replicati biologici, sono state considerate differenzialmente espresse.

Le proteine identificate sono state poi suddivise in classi in base alla loro funzione cellulare. Le classi funzionali utilizzate sono: metabolismo cellulare, biosintesi proteica, proteine contrattili e citoscheletriche, di adesione cellulare, coinvolte nella risposta allo stress, nella regolazione del DNA, ribosomali e altre. Il numero di proteine identificate per ogni classe è stato rappresentato mediante l'uso di grafici a torta. L'analisi è stata effettuata unicamente sui campioni di aorta di entrambi i modelli in quanto i risultati ottenuti mediante 2D-DIGE sulle arterie mesenteriche suggeriscono che i vasi di interesse in questi campioni non risultano completamente isolati dal tessuto circostante, limitando così il potere risolutivo delle tecnologie proteomiche adottate.

---

<sup>1</sup> Per calcolare la misura quantitativa dell'entità della variazione proteica a partire dal *ratio* delle mediane si utilizza lo stesso valore se il *ratio* è positivo; se è negativo si utilizza la formula: variazione =  $-\frac{1}{ratio\ mediane}$ .



### **7.3.2.1 Identificazioni proteiche dell'aorta**

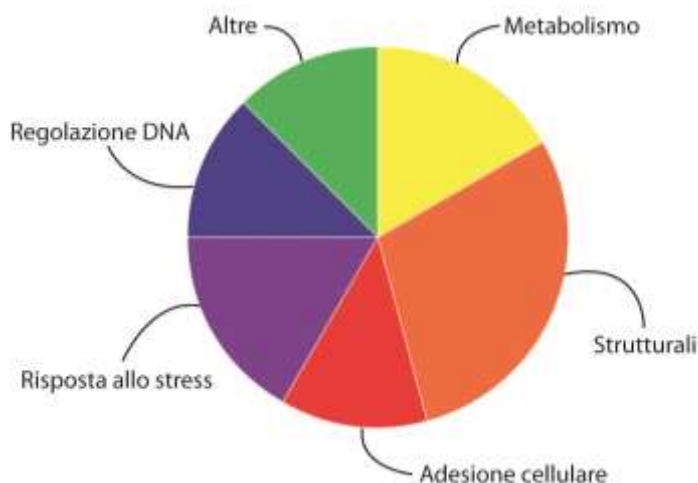
L'utilizzo di una tecnica proteomica complementare alla 2D-DIGE ha permesso di individuare ulteriori variazioni nell'aorta nei modelli presi in esame. Mediante ICPL sono state infatti identificate più di 1000 proteine espresse nei topi E1KO e flox-flox, di queste 24 sono risultate statisticamente variate nel modello E1KO e 27 nel modello flox-flox, in relazione ai rispettivi controlli (tabella 9, tabelle appendice 8 e 9). I cambiamenti sono stati osservati a livello delle stesse classi di proteine identificate mediante 2D-DIGE, quali proteine del metabolismo, strutturali, coinvolte nell'adesione cellulare e nella risposta allo stress, ma anche in altre proteine che regolano il DNA e ribosomali.

<b>Confronto</b>	<b>N° macchie differenzialmente espresse</b>	<b>N° macchie down-regolate</b>	<b>N° macchie up-regolate</b>
E1KO vs C57	24	4	20
flox-flox vs wt	27	5	22

**Tabella 9: Riassunto del numero di proteine differenzialmente espresse nell'aorta nei topi E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli, identificate mediante tecnologia ICPL.**

#### Confronto E1KO vs C57

Nella figura 41 sono riassunte le classi funzionali a cui appartengono le proteine identificate mediante ICPL nel modello E1KO.



**Figura 41: Classificazione in classi funzionali delle proteine differenzialmente espresse nell'aorta dei topi E1KO identificate mediante tecnologia ICPL.**

Tra le proteine metaboliche differenzialmente espresse, due sono risultate aumentate: l'*aconitate hydratase* (ACO2), un enzima del ciclo di Krebs che converte il citrato in isocitrato e la *fatty acid synthase* (FASN), che è coinvolta nella biosintesi degli acidi grassi. La *fructose-1,6-bisphosphatase* (F16P2), che catalizza un passaggio della gluconeogenesi, e l'*ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2* (UQCR2), una subunità del complesso III della catena respiratoria, sono invece diminuite.

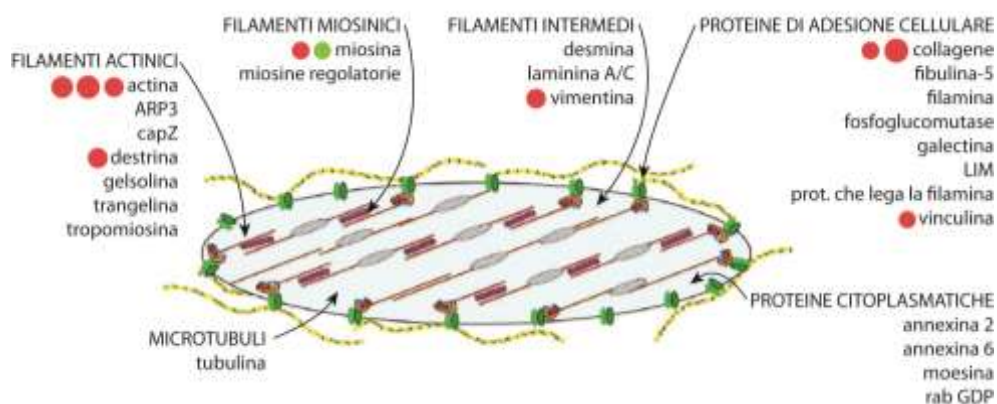
Nella classe delle proteine strutturali si verifica un aumento di una proteina dei filamenti intermedi (la *vimentin* - VIM), della *myosin-9* e di quattro proteine dei filamenti actinici: la *destrin* (DEST), coinvolta nella depolimerizzazione dei filamenti di actina, e tre isoforme dell'actina, tra cui l'*aortic smooth muscle actin* (ACTA) che è un *marker* di differenziamento delle SMC caratteristico del fenotipo contrattile (figura 42). Solo la *myosin-XVIIIa* (MY18A) risulta diminuita.

Delle proteine responsabili dell'adesione cellulare, sono state riscontrate variazioni in un'isoforma della *vinculin* (VINC) e si ha un aumento del

*collagen alpha-1* (CO1A1) e *alpha-2* (CO1A2).

Un aumento dell'espressione proteica interessa anche le proteine di risposta allo stress, come l'*heat shock protein beta-1* (HSPB1), la *serine/threonine-protein kinase* SMG1, che è coinvolta nell'*RNA nonsense-mediated decay* (NMD) e si attiva in presenza di danni al DNA, la *superoxide dismutase* (SODE) e la *glutathione S-transferase Mu 1* (GSTM1).

Di particolare interesse risulta l'incremento di alcune proteine identificate coinvolte nella regolazione del DNA, tra cui due subunità istoniche (H3.1 e H3.3) e la *structural maintenance of chromosomes protein 1A* (SMC1A), necessaria per l'unione dei cromatidi gemelli dopo la replicazione del DNA.

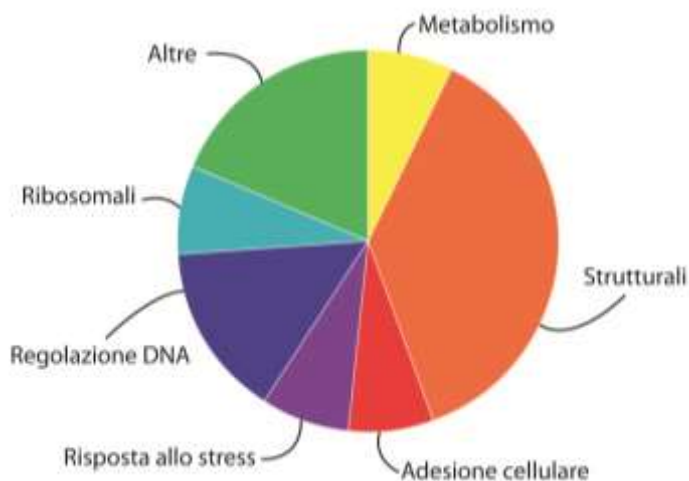


**Figura 42: Alterazioni proteiche identificate mediante ICPL a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello E1KO.**

Lo schema mostra la struttura di una SMC in cui sono indicate le proteine differenzialmente espresse del citoscheletro e dell'ECM. L'intensità della variazione è rappresentata mediante pallini: il colore rosso o verde indicano rispettivamente se la proteina è aumentata o diminuita, la grandezza è direttamente proporzionale all'intensità della variazione, il numero specifica quante proteine della stessa famiglia sono state identificate.

### Confronto flox-flox vs wt

La figura 43 mostra le classi funzionali a cui appartengono le proteine identificate mediante ICPL nel modello flox-flox.



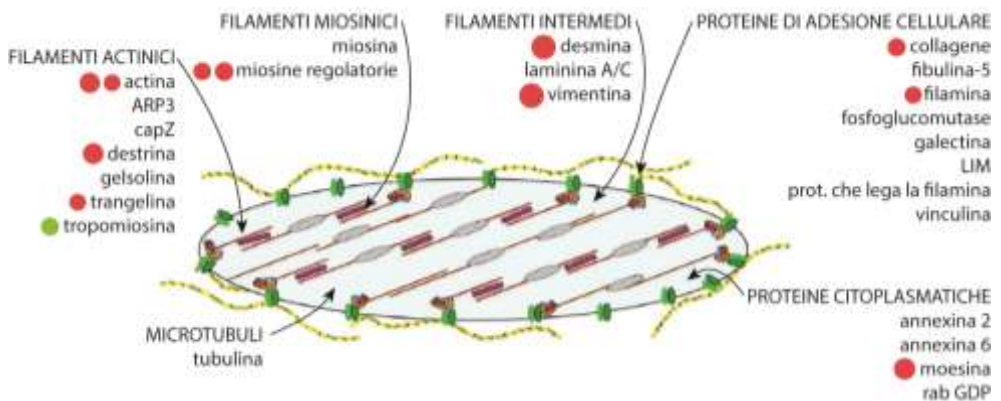
**Figura 43: Classificazione in classi funzionali delle proteine differenzialmente espresse nell'aorta dei topi flox-flox identificate mediante tecnologia ICPL.**

Mediante ICPL in questo modello sono state identificate due proteine glicolitiche aumentate: l'*alpha-enolase* (ENOA) e la *pyruvate kinase isozyme M2* (PKM2).

Anche le proteine strutturali presentano lo stesso andamento (figura 44), tranne la *tropomyosin alpha-4 chain* (TPM4). L'incremento dell'espressione proteica interessa alcune proteine dei filamenti intermedi (la *desmin* - DESM e un'isoforma della *vimentin* - VIM), altre coinvolte nella contrazione cellulare (la *myosin regulatory light chain 2* - MLRN e la *myosin light polypeptide 6* - MYL6). Sono state riscontrate variazioni anche nelle proteine dei filamenti actinici come la *desmin* (DESM) e alcune isoforme dell'actina citoplasmatica. Anche in questo modello, sfruttando una tecnologia complementare alla 2D-DIGE, sono state trovate aumentate la

*transgelin* e l'*alpha-actin-2* (ACTA), due marcatori del fenotipo contrattile delle SMC.

Tra le proteine responsabili dell'adesione cellulare che presentano un incremento dell'espressione proteica, sono state identificate il *collagen alpha-1* (CO1A1) e la *filamin-A* (FLMA), che permette il legame dei filamenti di actina alle glicoproteine di membrana.



**Figura 44: Alterazioni proteiche identificate mediante ICPL a livello del citoscheletro e dell'ECM nell'aorta del modello flox-flox.**

Lo schema mostra la struttura di una SMC in cui sono indicate le proteine differenzialmente espresse del citoscheletro e dell'ECM. L'intensità della variazione è rappresentata mediante pallini: il colore rosso o verde indicano rispettivamente se la proteina è aumentata o diminuita, la grandezza è direttamente proporzionale all'intensità della variazione, il numero specifica quante proteine della stessa famiglia sono state identificate.

Contrariamente al modello E1KO, tra le proteine di risposta allo stress la *superoxide dismutase* (SODE) risulta up-regolata, mentre la *serine/threonine-protein kinase SMG1* segue lo stesso andamento.

Mediante la tecnica ICPL nei topi flox-flox sono state identificate anche proteine coinvolte nella regolazione del DNA e dei ribosomi. Tra le proteine della prima classe si riscontra un aumento di alcune subunità istoniche

(H2A, H3, H4) e della *methyl-CpG-binding protein 2* (MECP2), una proteina che lega il DNA metilato determinando la repressione trascrizionale in seguito all'interazione con alcune istone deacetilasi. Alla seconda classe appartengono invece la *40S ribosomal protein S3a* (RS3A), una subunità dei ribosomi, e l'*rRNA-processing protein EBP2*.

Tra le altre proteine variate vi sono l'*annexin A2* (ANXA2), che è coinvolta nel legame al citoscheletro delle proteine associate alla membrana, nell'endocitosi, nella fibrinolisi e nell'esocitosi delle proteine intracellulari.

#### **7.4 Analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione nell'aorta**

Al fine di comprendere come viene regolata l'espressione delle proteine differenzialmente espresse, identificate mediante le tecnologie 2D-DIGE e ICPL, è stata effettuata un'analisi di arricchimento dei siti di legame di fattori di trascrizione (TFBS). L'analisi è stata eseguita mediante il software online *oPOSSUM 3.0* separatamente per le proteine up e down-regolate dei confronti E1KO vs C57 e flox-flox vs wt. Esso restituisce una lista di fattori che presentano siti di legame arricchiti sui geni che codificano per l'elenco di proteine inserito. Il software fornisce inoltre una misura della significatività attraverso due score: sono stati considerati arricchiti i siti con  $Z\text{-score} \geq 10$  e/o  $Fisher\ score \geq 7$ .

##### **7.4.1 Analisi di arricchimento dei TFBS nelle proteine dell'aorta identificate mediante 2D-DIGE**

La tabella 10 mostra l'elenco dei fattori di trascrizione che presentano TFBS arricchiti nei promotori dei geni delle proteine dell'aorta identificate mediante 2D-DIGE del modello E1KO e flox. Nel primo modello sono stati trovati 3 fattori che regolano l'espressione delle proteine diminuite e un solo fattore per le proteine aumentate. Mentre nel secondo modello, il software

ha individuato 8 fattori che controllano le proteine down-regolate e 8 che determinano un incremento di espressione proteica.

<b>Proteine</b>	<b>Fattori di trascrizione</b>	<b>Numero geni target</b>	<b>Z-score</b>	<b>Fisher score</b>
Modello E1KO diminuite	znf143	6	17,132	3,026
	Gfi	41	12,775	7
	NR2F1	16	11,463	5,707
Modello E1KO aumentate	Klf4	12	14,201	3,035
Modello flox diminuite	znf143	3	18,852	2,217
	SP1	13	16,24	1,509
	Pax4	1	15,306	2,58
	Klf4	16	13,969	2,515
	Ar	2	13,328	2,422
	MZF1_5-13	17	12,121	3,145
	PPARG::RXRA	9	11,002	2,656
	ZNF354C	22	10,416	5,976
Modello flox aumentate	SRF	7	18,409	8,596
	NR1H2::RXRA	2	16,054	4,626
	HNF4A	22	14,266	11,73
	RORA_1	24	12,397	8,21
	Esrrb	25	11,684	6,636
	Hand1::Tcfe2a	27	10,898	4,075
	NR2F1	11	10,255	4,371
	Klf4	29	10,056	8,248

**Tabella 10: Elenco dei fattori di trascrizione che presentano siti di legame arricchiti nei geni che codificano per le proteine statisticamente variare identificate mediante 2D-DIGE.**

Tra quelli che presentano un maggiore arricchimento troviamo SRF e KLF4, due fattori coinvolti nella regolazione dell'espressione delle proteine caratteristiche del fenotipo contrattile delle SMC. La tabella appendice 10

mostra l'elenco delle proteine controllate da questi fattori, la maggior parte di esse sono proteine strutturali o coinvolte nell'adesione cellulare. SRF e KLF4 regolano infatti l'espressione di alcune proteine che costituiscono i filamenti intermedi (la *lamin-A/C* e la *vimentin*), i microtubuli (*tubulin*), e i filamenti actinici (la *capping protein*, l'*actin-related protein 3* e la *tropomyosin*). Tra quelle coinvolte nella regolazione dei filamenti di actina è interessante notare la presenza di TFBS per questi due fattori sul gene SM22 $\alpha$ , che codifica per un marker del fenotipo contrattile (*transgelin*). Per quanto riguarda le proteine di adesione, troviamo la *vinculin*, la *LIM protein*, la *filamin-binding LIM protein 1*, la *galectin-1* e la fibulin-5, il cui incremento risulta regolato da SRF e KLF4.

#### 7.4.2 Analisi di arricchimento dei TFBS nelle proteine dell'aorta identificate mediante ICPL

Nella tabella 11 invece sono elencati i fattori di trascrizione che presentano TFBS arricchiti nei promotori dei geni delle proteine dell'aorta identificate mediante la tecnologia ICPL. Nei topi E1KO sono stati trovati 7 fattori che regolano l'espressione delle proteine diminuite e 2 fattori per le proteine aumentate. Nei topi flox-flox invece, il software ha individuato un fattore che controlla la diminuzione di espressione proteica e 15 che ne determinano un incremento.

Proteine	Fattori di trascrizione	Numero geni target	Z-score	Fisher score
Modello E1KO diminuite	RREB1	1	16,071	1,434
	ESR2	3	15,317	4,739
	INSM1	1	13,484	0,196
	Klf4	4	11,697	1,317
	Tcfcp2l1	5	10,804	3,862
	MZF1_1-4	5	10,476	1,603
	ZNF354C	5	10,02	1,359



Proteine	Fattori di trascrizione	Numero geni target	Z-score	Fisher score
Modello E1KO aumentate	MIZF	10	13,405	12,052
	SRF	4	12,174	4,742
Modello flox diminuite	ESR1	1	15,641	2,704
Modello flox aumentate	NFYA	21	23,485	11,645
	HIF1A::ARNT	29	22,455	10,038
	Esrrb	28	21,356	8,102
	Zfx	29	20,703	14,273
	E2F1	27	15,488	14,678
	Mycn	23	15,233	7,593
	PLAG1	9	14,153	8,256
	Myc	22	11,581	6,439
	Myf	23	11,268	3,504
	Pax6	7	11,069	6,221
	Arnt::Ahr	29	10,983	3,938
	SRF	4	10,974	3,13
	Arnt	20	10,809	7,068
	MZF1_1-4	36	10,336	9,15
	Klf4	32	10,144	9,57

**Tabella 11: Elenco dei fattori di trascrizione che presentano siti di legame arricchiti nei geni che codificano per le proteine statisticamente variare identificate mediante ICPL.**

Tra i fattori di maggiore interesse che presentano TFBS arricchiti nei geni delle proteine identificate sono stati individuati: MIZF, che promuove la trascrizione dell'istone H4, INSM1, che regola la repressione della trascrizione mediante il reclutamento delle istone deacetilasi (HDAC1, HDAC2 e HDAC3), NFYA, che stimola trascrizione della *beta-actin* e del *collagen-I*, e MYF, un fattore coinvolto nella differenziazione delle cellule muscolari. Oltre a questi troviamo SRF e KLF4, i cui siti di legame risultano

arricchiti per le proteine riportate nella tabella appendice 11. Tra queste troviamo principalmente le proteine strutturali che presentano un incremento dei livelli di espressione nei modelli E1KO e flox-flox rispetto ai relativi controlli. SRF e KLF4 regolano l'espressione di alcune proteine dei filamenti intermedi (la *desmin* e la *vimentin*), coinvolte nella contrazione cellulare (come la *myosin light polypeptide 6*) e che costituiscono i filamenti actinici (la *desmin* e alcune isoforme dell'actina citoplasmatica). Anche tra le proteine identificate mediante ICPL regolate da questi fattori sono state trovate aumentate la *transgelin*, l'*alpha-actin-2* e la *destrin*, tre marcatori del fenotipo contrattile delle SMC. Di particolare interesse è anche la presenza di TFBS per KLF4 sui geni che codificano per le subunità delle proteine istoniche.

## **8. DISCUSSIONE**

### ***8.1 I cambiamenti del proteoma dei piccoli e grandi vasi in carenza di Emilina-1***

Studi precedenti hanno dimostrato che l'aumento del tono miogeno e della resistenza arteriolare in carenza di Emilina-1 sono dovuti ad alti livelli di TGF- $\beta$  che alterano la funzionalità delle SMC [57]. L'analisi del proteoma delle arterie mesenteriche e dell'aorta di topo mediante due approcci proteomici complementari, la 2D-DIGE e l'ICPL, ha permesso di individuare quali alterazioni cellulari compromettono la funzionalità dei vasi durante questi processi.

La maggior parte delle variazioni dell'espressione proteica nei due modelli presi in esame sono state riscontrate a livello dell'aorta in quanto il campione analizzato è risultato isolato in modo migliore dal tessuto circostante, rispetto ai campioni di arterie mesenteriche. In generale, nel modello Emilina-1 KO, dove la proteina non viene espressa né nelle cellule endoteliali né nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi e questi risultano costitutivamente più piccoli, si nota una down-regolazione di gran parte delle proteine cellulari. Mentre nel modello Emilina-1 flox-flox, in cui la proteina viene silenziata solo nelle cellule della muscolatura liscia, le proteine cellulari risultano maggiormente over-esprese. In entrambi i modelli, le alterazioni proteiche più importanti interessano specifici processi cellulari: il metabolismo, la contrazione e la regolazione dell'espressione genica.

#### **8.1.1 Le alterazioni del metabolismo cellulare**

Nelle arterie mesenteriche e nell'aorta dei topi E1KO si nota una diminuzione di gran parte delle proteine coinvolte nel metabolismo cellulare. In particolare, nelle arterie mesenteriche si verifica una riduzione dell'espressione delle proteine responsabili della trasformazione del

piruvato in acetil-CoA, lattato e ossalacetato (la *pyruvate dehydrogenase*, la *lactate dehydrogenase* e la *pyruvate carboxilase*). Queste alterazioni potrebbero indicare una minore degradazione con conseguente accumulo di questo substrato. Nell'aorta invece le variazioni identificate interessano sia questo processo sia il ciclo di Krebs che la catena respiratoria. A queste si aggiunge la diminuzione di alcuni enzimi responsabili della  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi, un processo che permette la formazione di nuove molecole di acetil-CoA da metabolizzare nel ciclo di Krebs. In queste cellule sembra quindi instaurarsi una disregolazione metabolica mitocondriale.

Questi organelli sono responsabili della produzione di energia, ma anche della regolazione della concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico, della generazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'apoptosi. Alterazioni nella struttura e nella funzione mitocondriale sono state riscontrate in ipertensione polmonare [84-86], associate ad un cambiamento del metabolismo da ossidativo a glicolitico. In questo processo il piruvato viene trasformato in lattato anziché essere metabolizzato nel ciclo di Krebs e la disponibilità di aminoacidi, lipidi e carboidrati aumenta per favorire una rapida crescita cellulare. Tuttavia questo cambiamento metabolico, scoperto inizialmente nelle cellule tumorali, chiamato *Warburg effect* non sembra instaurarsi nelle cellule prese in esame in quanto non sono stati trovati enzimi glicolitici aumentati. Tuttavia, le alterazioni mitocondriali caratteristiche dell'ipertensione polmonare potrebbero spiegare alcune variazioni metaboliche riscontrate nei topi E1KO. Da una parte suggeriscono infatti la presenza di una struttura/funzione mitocondriale alterata, dall'altra indicano un possibile aumento dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatici.

L'ipertensione arteriosa è caratterizzata infatti da una profonda alterazione dell'omeostasi del  $\text{Ca}^{2+}$  [87-90]. Ormoni e fattori di crescita attivano vie di segnale intracellulari che determinano il rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo

endoplasmatico. Il segnale viene poi mantenuto mediante l'apertura di canali sulla superficie della membrana plasmatica che permettono l'entrata dello ione dall'ambiente extracellulare nel citoplasma. Questo ione nelle SMC è fondamentale per la contrazione cellulare, funge da secondo messaggero in alcune vie di trasduzione del segnale ed è un co-fattore di molti enzimi. La sua omeostasi è regolata dal reticolo endoplasmatico e dai mitocondri. Questi ultimi presentano un canale sulla loro membrana esterna che a contatto con microdomini ricchi di  $\text{Ca}^{2+}$  ne determina l'internalizzazione [91]. Una riduzione della produzione di ATP mitocondriale può influire su questo processo: una disfunzione della catena respiratoria determina una perdita del potenziale di membrana mitocondriale necessario per l'ingresso del  $\text{Ca}^{2+}$  nell'organello. Si verifica così una diminuzione della concentrazione interna di  $\text{Ca}^{2+}$  che compromette l'attività di alcuni enzimi del ciclo di Krebs [91, 92] e un suo aumento nel citoplasma che influisce sull'attività contrattile e sull'attivazione di alcune vie di segnale.

Inoltre a livello del metabolismo degli acidi grassi e del colesterolo in questi topi la variazione di alcune proteine responsabili di questi processi potrebbe suggerire la deposizione di lipidi a livello della parete vasale. Le SMC risultano infatti coinvolte nella formazione di placche aterosclerotiche [93], una delle principali conseguenze della modificazione della struttura dei vasi che porta ad un peggioramento dello stato ipertensivo.

Nell'aorta del modello flox-flox invece, l'attività mitocondriale sembra aumentata. Si verifica infatti un incremento di alcune proteine del ciclo di Krebs e di altre coinvolte nella produzione di alcuni dei suoi intermedi, tra cui la *glutamate dehydrogenase 1*, la *pyruvate carboxilase* ed il *malic enzyme*. La  $\beta$ -ossidazione degli acidi grassi resta ancora prevalentemente down-regolata. Questi risultati suggeriscono che, in seguito al silenziamento del gene Emilina-1 dopo la nascita, all'interno della cellula si

verifica una riorganizzazione del flusso metabolico diretto ad una maggiore produzione di energia. Quest'ultima risulta probabilmente necessaria per l'aumento della contrazione e della sintesi proteica descritte in seguito.

### **8.1.2 Le alterazioni della contrazione cellulare**

Nelle SMC vascolari la contrazione cellulare avviene attraverso due meccanismi indipendenti: la fosforilazione della catena leggera della miosina che porta allo scorrimento dei filamenti di actina e miosina e la polimerizzazione dell'actina accoppiata al rimodellamento del citoscheletro. In ipertensione entrambi questi processi determinano un aumento della tensione cellulare che provoca un incremento del tono miogeno ed il restringimento del diametro del vaso. Molte delle proteine differenzialmente espresse, in entrambi i modelli animali presi in esame, sono componenti del citoscheletro e dell'ECM responsabili della contrazione cellulare.

Per quanto riguarda il primo meccanismo di contrazione, nell'aorta del modello E1KO sono state trovate due proteine della famiglia delle miosine (la *myosin* e la *myosin-XVIIIa*) diminuite mentre la *myosin-9* e *myosin regulatory light polypeptide 9* risultano aumentate. Nel modello flox-flox invece vi è un aumento di tutte le proteine identificate di questa famiglia (*myosin*, *myosin light polypeptide 6* e *myosin regulatory light chain 2*). Questi risultati dimostrano che il processo di contrazione cellulare basato sullo scorrimento dei filamenti di actina e miosina risulta alterato in entrambi i modelli. In particolare, la *myosin regulatory light chain 2* e la sua isoforma *myosin regulatory light polypeptide 9* svolgono un ruolo importante nella contrazione delle SMC in quanto la loro fosforilazione aumenta l'attività ATPasica della miosina permettendo il colpo di forza. Il loro aumento è un indice dell'incremento dell'attività contrattile.

Anche molte proteine della famiglia dell'actina (le *smooth muscle alpha*, *beta* e *gamma actin*) risultano aumentate in questi topi, permettendo di

ipotizzare un'alterazione anche del secondo meccanismo di contrazione che coinvolge non solo i filamenti actinici ma anche il citoscheletro e l'ECM. Nel modello E1KO si riscontra una riduzione di molte isoforme delle proteine dei filamenti intermedi e dei microtubuli, che determinano una perdita della struttura citoscheletrica. Al contrario i filamenti actinici sembrano stabilizzati, come conferma l'aumento di due proteine che ne regolano l'assemblamento-disassemblamento (la *tropomyosin* e la *capping protein*). Anche la struttura dell'ECM, in mancanza di Emilina-1 fin dalla nascita, risulta compromessa in questi topi. Si verifica una perdita di due proteine solitamente aumentate nelle SMC in ipertensione: la *phosphoglucosaminidase*, una componente delle giunzioni cellula-cellula e cellula-matrice e il *collagen VI*, mentre la *galectin-1* risulta aumentata. Quest'ultima favorisce la diminuzione del tono vasale mediante l'internalizzazione di un canale per il  $\text{Ca}^{2+}$  presente sulla membrana plasmatica. Questi cambiamenti dell'ECM e del citoscheletro indicano che in queste cellule si verifica una perdita della struttura cellulare accompagnata dall'attivazione di meccanismi coinvolti nella riduzione della rigidità dei vasi in seguito ad uno stato ipertensivo persistente.

Il modello flox-flox invece sembra caratterizzato da un sostanziale rimodellamento del citoscheletro e dell'ECM dovuto ad un aumento della sintesi delle sue componenti. Si verifica infatti un incremento di molte isoforme delle proteine dei filamenti intermedi e dei microtubuli. Anche le proteine coinvolte nel rimodellamento dei filamenti actinici risultano aumentate, sia quelle che ne controllano l'assemblamento (*ARP3* e *gelsolin*) che la disaggregazione (*destrin*). A queste si aggiungono due isoforme della *tropomyosin*, una proteina coinvolta nella stabilizzazione dei filamenti di actina, e della *vinculin*, che permette la connessione dei nuovi filamenti alle integrine. L'ECM è caratterizzata da un maggiore sintesi di *collagen VI* e della *fibulin-5*. Precedenti studi hanno evidenziato la

presenza di alterazioni in queste due proteine in ipertensione [50], inoltre un incremento di TGF- $\beta$  è associato ad una maggiore sintesi e ad una minore degradazione dell'ECM. Un aumento di *collagen VI* determina una minore distensione dei vasi, la *fibulin-5* invece è una componente dell'ECM necessaria per l'assemblamento e il legame alle integrine delle fibre di elastina. In letteratura è stato dimostrato che la mancanza di Emilina-1, a cui risulta associata, destabilizza la sua funzione [56]. La carenza di Emilina-1 nei topi flox-flox sembra quindi innescare un segnale meccanico all'interno delle SMC che porta da una parte alla deposizione di nuovi componenti del citoscheletro e dell'ECM, dall'altra ad un rimodellamento della struttura cellulare con probabile formazione di filamenti actinici corticali che favoriscono la trasmissione della forza di contrazione.

### **8.1.3 La regolazione dell'espressione genica**

Le SMC sono caratterizzate dalla capacità di modificare il proprio fenotipo in risposta a segnali ambientali, tra cui le alterazioni della pressione arteriosa. Queste cellule possono infatti presentare un fenotipo contrattile o sintetico, ognuno dei quali produce specifiche proteine cellulari. La regolazione dell'espressione genica dei *marker* fenotipici è dovuta all'interazione tra regioni geniche conservate (*CARg elements*) e fattori di trascrizione: SRF regola la trascrizione dei geni del fenotipo contrattile mentre KLF4 ne reprime l'espressione. Come descritto precedentemente, le vie di segnale che vengono attivate nelle SMC in seguito ad un aumento della pressione arteriosa portano alla trascrizione dei geni del fenotipo contrattile. Sia l'aumento di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico che il *signaling* delle Rho chinasi agiscono su SRF favorendo l'espressione delle regioni geniche sotto il suo controllo.

Sulle sequenze geniche delle proteine differenzialmente espresse identificate nell'aorta, mediante tecnologia 2D-DIGE e ICPL, sia SRF che



KLF4 presentano siti di legame arricchiti. In particolare in questi modelli animali, risultano coinvolti nella regolazione della trascrizione di gran parte delle proteine citoscheletriche e dell'ECM.

Nel modello E1KO SRF presenta TBFS sulla sequenza genica dell'*alpha actin*, della *gamma actin* e della *myosin-9*, la cui espressione risulta aumentata. In questi topi altre proteine over-esprese presentano nei loro promotori TBFS arricchiti per il legame di KLF4, tra queste troviamo la *14-3-3 zeta*, la *capping protein*, la *LIM protein*, la *myosin-XVIII*, la *filamin-binding LIM protein*, la *galectin-1* e la *transgelin*, proteine coinvolte nel rimodellamento del citoscheletro e nella contrazione cellulare (tabella appendice 10 e 11). Tra quelle citate l'*alpha actin* e la *transgelin* sono due marcatori del fenotipo contrattile delle SMC. Queste variazioni suggeriscono la trasformazione delle SMC in cellule con una struttura principalmente contrattile, in cui avviene un rimodellamento dell'ECM e del citoscheletro. I meccanismi alla base di questo processo potrebbero essere due: uno stress meccanico dovuto alle alterazioni dell'ECM e/o un incremento di TGF- $\beta$ . Entrambi questi processi portano all'attivazione di vie di segnale intracellulari che regolano SRF e conseguentemente KLF4, favorendo l'espressione di proteine di questo fenotipo [40, 42, 60, 64].

Gli stessi meccanismi sono probabilmente responsabili dello *shift* fenotipico delle SMC nei topi flox-flox, suggerito dalla maggiore espressione di tre marcatori del fenotipo contrattile (l'*alpha actin*, la *destrin* e la *transgelin*). Anche in questo modello sono state trovate proteine aumentate che presentano TBFS per SRF e KLF4 (tabella appendice 10 e 11): l'*alpha actin*, l'*ARP3*, la *destrin*, la *transgelin*, la *tropomyosin*, dei filamenti actinici, la *desmin* e la *lamin A/C*, dei filamenti intermedi, la *fibulin-5*, la *filamin-binding LIM protein* e la *vinculin*, coinvolte nell'adesione cellulare, la *tubulin* e la *myosin light 6*, rispettivamente dei microtubuli e dei filamenti miosinici. Le proteine che vengono espresse in questi topi, contrariamente al modello

E1KO, indicano una maggiore produzione di proteine citoscheletriche che, come spiegato nel paragrafo precedente, determinano la deposizione di filamenti actinici e di altri filamenti rendendo la struttura della cellula più rigida.

Tra i geni che presentano TFBS per KLF4 in entrambi i modelli, inoltre è interessante notare la presenza degli istoni H2A, H3, H4 e di altre proteine coinvolte nel mantenimento della struttura dei cromosomi, la cui espressione risulta aumentata. Alterazioni epigenetiche nelle code di questi istoni regolano la trascrizione dei *marker* del fenotipo contrattile nelle SMC. Le acetilazioni degli istoni H3 e H4 (H3Ac e H4Ac) e le dimetilazioni delle lisine 4 e 79 dell'istone H3 (H3K4diMe e H3K79diMe) determinano l'apertura della cromatina permettendo il legame del complesso SRF-miocardina ai *CAR*G *elements* di questi geni. Nonostante questo meccanismo sia ampiamente descritto in letteratura, le variazioni quantitative delle proteine istoniche restano ancora da chiarire. Il lavoro di Talati e al. [94] ha dimostrato che in ipertensione polmonare l'espressione dell'istone H1 risulta alterata nelle SMC delle arterie polmonari: presenta infatti un decremento nel nucleo e un aumento nel citoplasma. La riduzione della quantità nucleare di H1 sembra determinata da due fattori: la frammentazione della proteina e un suo minore importo nel nucleo da parte delle importine. Queste variazioni sono accompagnate dalla presenza di una struttura cromatinica meno condensata che potrebbe modificare la trascrizione cellulare. Deplezioni in altri istoni non sono ancora state documentate, tuttavia le alterazioni riscontrate nelle arterie in carenza di Emilina-1 potrebbero suggerire che anche in questo caso si verifica una minore condensazione della cromatina accompagnata da un incremento della trascrizione genica. Ulteriori studi sono però necessari per comprendere la localizzazione degli istoni identificati e i loro effetti sulle variazioni dell'espressione genica.

## 9. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Questo studio mette in evidenza le principali alterazioni proteiche dovute alla carenza di Emilina-1 a livello dei vasi sanguigni, permettendo la caratterizzazione dei due modelli animali presi in esame.

L'Emilina-1 è espressa nell'endocardio, nei miociti del ventricolo destro e nelle pareti dei vasi sanguigni (sia dalle cellule endoteliali che dalle cellule muscolari lisce e dai fibroblasti della tonaca avventizia). Studi precedenti hanno dimostrato che il mantenimento di un tono miogeno arterioso aumentato è dovuto ad alti livelli di TGF- $\beta$  indotti dalla carenza di Emilina-1 nelle SMC [57].

Nel modello Emilina-1 KO la proteina non si esprime né nelle cellule endoteliali, né nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi. In questi topi si nota una down-regolazione di gran parte delle proteine cellulari, che permette di ipotizzare la presenza di una muscolatura liscia adattata a vasi costitutivamente più piccoli. Nelle SMC dell'aorta si verifica una disregolazione metabolica associata ad una disfunzione mitocondriale, una perdita delle proteine citoscheletriche e l'attivazione di meccanismi per contrastare la rigidità vasale. Alcune proteine suggeriscono inoltre la trasformazione di queste cellule in SMC principalmente con funzione contrattile, associata ad un incremento dell'attività di contrazione cellulare. I cambiamenti osservati sembrano riflettere il comportamento di una cellula adattata alla presenza di un'ipertensione persistente, perciò i topi Emilina-1 KO possono essere definiti come un modello di adattamento a una condizione di ipertensione congenita.

Nel modello Emilina-1 flox-flox invece l'espressione della proteina viene silenziata solo nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi. In questi topi si nota una up-regolazione di gran parte delle proteine cellulari. Le SMC dell'aorta di questo modello presentano un incremento della produzione di energia, dell'attività contrattile e della trascrizione genica, che porta alla

produzione di proteine del citoscheletro e dell'ECM. Anche in questi topi le SMC esprimono marcatori del fenotipo contrattile. Queste variazioni indicano l'attivazione di processi necessari per restringere il lume vasale, che identificano i topi flox-flox come un modello in cui si sta instaurando uno stato ipertensivo in risposta all'improvvisa carenza di Emilina-1.

In entrambi i modelli l'incremento di TGF- $\beta$  porta ad alterazioni dell'espressione genica, associati a modificazioni della cromatina, e ad un rimodellamento della struttura cellulare. I due modelli attivano probabilmente vie di segnale intracellulari simili, ma riflettono due diversi stadi di progressione della patologia. Ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio le modificazioni della struttura cromatina che influiscono sull'espressione genica e conseguentemente sul rimodellamento dell'apparato contrattile cellulare.

Recenti studi di associazione nell'uomo inoltre hanno confermato che tre polimorfismi a singolo nucleotide, localizzati nella regione non codificante del gene Emilina-1, sono marcatori genetici di ipertensione essenziale in differenti popolazioni maschili asiatiche [95, 96]. Perciò, sarebbe auspicabile traslare i risultati ottenuti in questi modelli animali all'uomo, per individuare nuovi target per la prevenzione e/o la terapia dell'ipertensione arteriosa, anche in altre etnie.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Coffman, T.M., Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. *Nat Med*, 2011. 17(11): p. 1402-9.
2. WorldHealthOrganization, Global status report on noncommunicable diseases 2010. 2010.
3. Mancia, G., et al., 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*, 2013. 31(7): p. 1281-357.
4. Whelton, P.K., et al., Primary prevention of hypertension: clinical and public health advisory from The National High Blood Pressure Education Program. *JAMA*, 2002. 288(15): p. 1882-8.
5. Carretero, O.A. and S. Oparil, Essential hypertension. Part I: definition and etiology. *Circulation*, 2000. 101(3): p. 329-35.
6. Cohuet, G. and H. Struijker-Boudier, Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther*, 2006. 111(1): p. 81-98.
7. Silverthorn, D.U., *Fisiologia. Un approccio integrato*. Terza Edizione. ed2007: Casa Editrice Ambrosiana.
8. Raman, M. and M.H. Cobb, TGF-beta regulation by Emilin1: new links in the etiology of hypertension. *Cell*, 2006. 124(5): p. 893-5.
9. Martinez-Lemus, L.A., The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2012. 110(1): p. 5-11.
10. Owens, G.K., M.S. Kumar, and B.R. Wamhoff, Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 2004. 84(3): p. 767-801.
11. Spin, J.M., L. Maegdefessel, and P.S. Tsao, Vascular smooth muscle cell phenotypic plasticity: focus on chromatin remodelling. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(2): p. 147-55.
12. Beamish, J.A., et al., Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010. 16(5): p. 467-91.
13. Chamley-Campbell, J., G.R. Campbell, and R. Ross, The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, 1979. 59(1): p. 1-61.
14. Hedin, U. and J. Thyberg, Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth-muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation*, 1987. 33(3): p. 239-46.

15. Rzucidlo, E.M., K.A. Martin, and R.J. Powell, Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*, 2007. 45 Suppl A: p. A25-32.
16. Christen, T., et al., Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation*, 2001. 103(6): p. 882-8.
17. Sotturrai, V.S., et al., Distal anastomotic intimal hyperplasia: histopathologic character and biogenesis. *Ann Vasc Surg*, 1989. 3(1): p. 26-33.
18. Thyberg, J., et al., Phenotypic modulation of smooth muscle cells during the formation of neointimal thickenings in the rat carotid artery after balloon injury: an electron-microscopic and stereological study. *Cell Tissue Res*, 1995. 281(3): p. 421-33.
19. Manderson, J.A., et al., Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis*, 1989. 9(3): p. 289-98.
20. Aikawa, M., et al., Redifferentiation of smooth muscle cells after coronary angioplasty determined via myosin heavy chain expression. *Circulation*, 1997. 96(1): p. 82-90.
21. Kocher, O., et al., Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. *Biochemical and morphologic studies. Lab Invest*, 1991. 65(4): p. 459-70.
22. Thyberg, J., et al., Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem*, 1997. 45(6): p. 837-46.
23. Alexander, M.R. and G.K. Owens, Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol*, 2012. 74: p. 13-40.
24. Mericskay, M., et al., An overlapping CArG/octamer element is required for regulation of desmin gene transcription in arterial smooth muscle cells. *Dev Biol*, 2000. 226(2): p. 192-208.
25. Li, L., et al., Expression of the SM22alpha promoter in transgenic mice provides evidence for distinct transcriptional regulatory programs in vascular and visceral smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 1996. 132(5): p. 849-59.
26. Mack, C.P. and G.K. Owens, Regulation of smooth muscle alpha-actin expression in vivo is dependent on CArG elements within the 5' and first intron promoter regions. *Circ Res*, 1999. 84(7): p. 852-61.
27. Kim, S., et al., A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cell sublineages. *Mol Cell Biol*, 1997. 17(4): p. 2266-78.
28. Manabe, I. and G.K. Owens, CArG elements control smooth muscle subtype-specific expression of smooth muscle myosin in vivo. *J Clin Invest*, 2001. 107(7): p. 823-34.

29. Yano, H., et al., Transcriptional regulation of the chicken caldesmon gene. Activation of gizzard-type caldesmon promoter requires a CArG box-like motif. *J Biol Chem*, 1995. 270(40): p. 23661-6.
30. Kawai-Kowase, K. and G.K. Owens, Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 292(1): p. C59-69.
31. Cheung, P., C.D. Allis, and P. Sassone-Corsi, Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell*, 2000. 103(2): p. 263-71.
32. Manabe, I. and G.K. Owens, Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle-specific regulatory regions during differentiation of a novel P19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circ Res*, 2001. 88(11): p. 1127-34.
33. McDonald, O.G., et al., Control of SRF binding to CArG box chromatin regulates smooth muscle gene expression in vivo. *J Clin Invest*, 2006. 116(1): p. 36-48.
34. Yoshida, T., et al., Platelet-derived growth factor-BB represses smooth muscle cell marker genes via changes in binding of MKL factors and histone deacetylases to their promoters. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007. 292(2): p. C886-95.
35. Yoshida, T., Q. Gan, and G.K. Owens, Kruppel-like factor 4, Elk-1, and histone deacetylases cooperatively suppress smooth muscle cell differentiation markers in response to oxidized phospholipids. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 295(5): p. C1175-82.
36. Liu, Y., et al., Kruppel-like factor 4 abrogates myocardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem*, 2005. 280(10): p. 9719-27.
37. Cordes, K.R., et al., miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*, 2009. 460(7256): p. 705-10.
38. Xin, M., et al., MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev*, 2009. 23(18): p. 2166-78.
39. Berridge, M.J., Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*, 2008. 586(Pt 21): p. 5047-61.
40. Rolfe, B.E., et al., Rho and vascular disease. *Atherosclerosis*, 2005. 183(1): p. 1-16.
41. Sanders, K.M., Regulation of smooth muscle excitation and contraction. *Neurogastroenterol Motil*, 2008. 20 Suppl 1: p. 39-53.
42. Kudryavtseva, O., C. Aalkjaer, and V.V. Matchkov, Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca<sup>2+</sup>-dependent transcription factors. *FEBS J*, 2013. 280(21): p. 5488-99.

43. Gunst, S.J. and W. Zhang, Actin cytoskeletal dynamics in smooth muscle: a new paradigm for the regulation of smooth muscle contraction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008. 295(3): p. C576-87.
44. Lim, S.M., et al., RhoA-induced cytoskeletal tension controls adaptive cellular remodeling to mechanical signaling. *Integr Biol (Camb)*, 2012. 4(6): p. 615-27.
45. Cipolla, M.J., N.I. Gokina, and G. Osol, Pressure-induced actin polymerization in vascular smooth muscle as a mechanism underlying myogenic behavior. *FASEB J*, 2002. 16(1): p. 72-6.
46. Flavahan, N.A., et al., Imaging remodeling of the actin cytoskeleton in vascular smooth muscle cells after mechanosensitive arteriolar constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. 288(2): p. H660-9.
47. Faury, G., et al., Developmental adaptation of the mouse cardiovascular system to elastin haploinsufficiency. *J Clin Invest*, 2003. 112(9): p. 1419-28.
48. Raines, E.W., The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int J Exp Pathol*, 2000. 81(3): p. 173-82.
49. Ponticos, M. and B.D. Smith, Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res*, 2014. 28(1): p. 25-39.
50. Arribas, S.M., A. Hinek, and M.C. Gonzalez, Elastic fibres and vascular structure in hypertension. *Pharmacol Ther*, 2006. 111(3): p. 771-91.
51. Brooke, B.S., A. Bayes-Genis, and D.Y. Li, New insights into elastin and vascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 2003. 13(5): p. 176-81.
52. D'Armiento, J., Decreased elastin in vessel walls puts the pressure on. *J Clin Invest*, 2003. 112(9): p. 1308-10.
53. Wu, D., et al., Molecular mechanisms of thoracic aortic dissection. *J Surg Res*, 2013. 184(2): p. 907-24.
54. Colombatti, A., et al., The EMILIN/Multimerin family. *Front Immunol*, 2011. 2: p. 93.
55. Colombatti, A., et al., The EMILIN protein family, in *Matrix Biol* 2000. p. 289-301.
56. Zanetti, M., et al., EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 638-50.
57. Litteri, G., et al., Vascular smooth muscle emilin-1 is a regulator of arteriolar myogenic response and blood pressure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. 32(9): p. 2178-84.
58. Zacchigna, L., et al., Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 2006. 124(5): p. 929-42.



59. ten Dijke, P. and H.M. Arthur, Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(11): p. 857-69.
60. Pardali, E. and P. Ten Dijke, TGFbeta signaling and cardiovascular diseases. *Int J Biol Sci*, 2012. 8(2): p. 195-213.
61. Jakobsson, L. and L.A. van Meeteren, Transforming growth factor beta family members in regulation of vascular function: in the light of vascular conditional knockouts. *Exp Cell Res*, 2013. 319(9): p. 1264-70.
62. Pardali, E., M.J. Goumans, and P. ten Dijke, Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*, 2010. 20(9): p. 556-67.
63. Ghosh, J., et al., The role of transforming growth factor beta1 in the vascular system. *Cardiovasc Pathol*, 2005. 14(1): p. 28-36.
64. Goumans, M.J., Z. Liu, and P. ten Dijke, TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction. *Cell Res*, 2009. 19(1): p. 116-27.
65. Thongboonkerd, V., Genomics, proteomics and integrative "omics" in hypertension research. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2005. 14(2): p. 133-9.
66. Carty, D.M., E. Schiffer, and C. Delles, Proteomics in hypertension. *J Hum Hypertens*, 2013. 27(4): p. 211-6.
67. Kellermann, J., ICPL--isotope-coded protein label. *Methods Mol Biol*, 2008. 424: p. 113-23.
68. Ong, S.E., The expanding field of SILAC. *Anal Bioanal Chem*, 2012. 404(4): p. 967-76.
69. Gygi, S.P., et al., Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*, 1999. 17(10): p. 994-9.
70. Gygi, S.P., B. Rist, and R. Aebersold, Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Curr Opin Biotechnol*, 2000. 11(4): p. 396-401.
71. Kellermann, J. and F. Lottspeich, Isotope-coded protein label. *Methods Mol Biol*, 2012. 893: p. 143-53.
72. Daltonics, B., Application Note MT-106: Isotope-Coded Protein Labeling (ICPL) for Quantitative Proteomics Workflows Compatible with Protein Separation Strategies. 2010.
73. Kwon, A.T., et al., oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. *G3 (Bethesda)*, 2012. 2(9): p. 987-1002.
74. Neuville, P., et al., Cellular retinol-binding protein-1 is expressed by distinct subsets of rat arterial smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Am J Pathol*, 1997. 150(2): p. 509-21.

75. Kim, Y.H., et al., Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase ameliorates spontaneous hypertension in an animal model via modulation of eNOS activity. *Cardiovasc Res*, 2011. 91(3): p. 519-27.
76. Moiseeva, E.P., et al., A novel dystrophin/utrophin-associated protein is an enzymatically inactive member of the phosphoglucomutase superfamily. *Eur J Biochem*, 1996. 235(1-2): p. 103-13.
77. Wang, J., et al., Splice variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel by galectin-1 regulates arterial constriction. *Circ Res*, 2011. 109(11): p. 1250-8.
78. Mishra, S., et al., Interaction of annexin A6 with alpha actinin in cardiomyocytes. *BMC Cell Biol*, 2011. 12: p. 7.
79. Gerke, V., C.E. Creutz, and S.E. Moss, Annexins: linking Ca<sup>2+</sup> signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. 6(6): p. 449-61.
80. Enrich, C., et al., Annexin A6-Linking Ca(2+) signaling with cholesterol transport. *Biochim Biophys Acta*, 2011. 1813(5): p. 935-47.
81. Silacci, P., et al., Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2614-23.
82. Tung, J.J. and J. Kitajewski, Chloride intracellular channel 1 functions in endothelial cell growth and migration. *J Angiogenes Res*, 2010. 2: p. 23.
83. Harry, J.L., et al., Proteomics: capacity versus utility. *Electrophoresis*, 2000. 21(6): p. 1071-81.
84. Cottrill, K.A. and S.Y. Chan, Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: the expanding relevance of the Warburg effect. *Eur J Clin Invest*, 2013. 43(8): p. 855-65.
85. Freund-Michel, V., et al., Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014. 55C: p. 93-97.
86. Paulin, R. and E.D. Michelakis, The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*, 2014. 115(1): p. 148-64.
87. Noorani, M.M., R.C. Noel, and S.P. Marrelli, Upregulated TRPC3 and Downregulated TRPC1 Channel Expression during Hypertension is Associated with Increased Vascular Contractility in Rat. *Front Physiol*, 2011. 2: p. 42.
88. Sugiyama, T., et al., Abnormal calcium handling in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1990. 8(4): p. 369-75.
89. Bendhack, L.M., R.V. Sharma, and R.C. Bhalla, Altered signal transduction in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1992. 19(2 Suppl): p. II142-8.
90. Touyz, R.M. and E.L. Schiffrin, Role of calcium influx and intracellular calcium stores in angiotensin II-mediated calcium hyper-responsiveness in smooth muscle from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*, 1997. 15(12 Pt 1): p. 1431-9.

91. Yu, E., J. Mercer, and M. Bennett, Mitochondria in vascular disease. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(2): p. 173-82.
92. McCormack, J.G., A.P. Halestrap, and R.M. Denton, Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 1990. 70(2): p. 391-425.
93. Lacolley, P., et al., The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res*, 2012. 95(2): p. 194-204.
94. Talati, M., et al., Altered expression of nuclear and cytoplasmic histone H1 in pulmonary artery and pulmonary artery smooth muscle cells in patients with IPAH. *Pulm Circ*, 2012. 2(3): p. 340-51.
95. Shimodaira, M., et al., Association study of the elastin microfibril interfacer 1 (EMILIN1) gene in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2010. 23(5): p. 547-55.
96. Liu, C. and B. Xi, Pooled analyses of the associations of polymorphisms in the GRK4 and EMILIN1 genes with hypertension risk. *Int J Med Sci*, 2012. 9(4): p. 274-9.



## 11. APPENDICI

Tabella appendice 1: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Glicolisi	phosphoglycerate mutase 1	PGAM1	-1,21	1839	Q9DBJ1	28,8	6,8
Metabolismo del piruvato	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	DLAT	-1,22	701	Q8BMF4	67,9	9,6
	Ldha protein	LDHA	-1,48	1630	Q99K20	34,5	9,2
	Me1 protein	ME1	-1,8	827	Q99LF5	63,8	7,1
	Me1 protein	ME1	-1,8	831	Q99LF5	63,8	7,1
	Pyruvate carboxylase	PC	-1,53	185	Q05920	129,6	6,3
	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	PDHA1	-1,92	1250	P35486	43,2	9,4
Shuttle del glicerolo	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1	-1,75	1625	P13707	37,5	6,9
	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1	-1,83	1627	P13707	37,5	6,9
Via dei pentosi	transketolase	TKT	-1,82	742	P40142	67,6	7,9
	transketolase	TKT	-1,64	746	P40142	67,6	7,9
Metabolismo degli zuccheri	aldose reductase	AKR1B1	-1,59	1594	P45376	35,7	6,9
	trans-1,2-dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase	DHDH	-1,37	1472	Q9DBB8	36,3	6

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Metabolismo degli aminoacidi	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial	HIBCH	-1,41	1497	Q8QZS1	43	9
	branched-chain amino acid aminotransferase	BCAT2	-1,38	1476	O88374	39,7	8,8
	glutamine synthetase	GLUL	-1,51	1324	P15105	42,1	6,7
	indolethylamine N-methyltransferase	INMT	-1,37	1855	P40936	29,4	6
	isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	IVD	-1,42	1370	Q9JHI5	46,3	9,3
Altre	aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	ALDH	-1,46	2227	P47738	56,5	8,6
	carbonic anhydrase 3	CA3	-1,5	1844	P16015	29,3	7,1

**Tabella appendice 2: Elenco delle proteine significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Strutturali	desmin	DES	1,3	1035	P31001	53,5	5,1
Risposta allo stress	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	1,69	2279	P20029	72,4	4,9
	endoplasmic	HSP90B1	1,31	261	P08113	92,4	4,6
	protein disulfide-isomerase A2	PDIA2	3,72	722	D3Z6P0	58,3	4,7
	protein disulfide-isomerase	PDIA	2,15	852	P09103	57	4,6
Signaling	rho GDP-dissociation inhibitor 1	ARHGDI A	1,47	1909	Q99PT1	23,4	5

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Altre	annexin A2	ANXA2	-1,51	1590	P07356	38,7	8,5
	apolipoprotein A-I preproprotein	APOA1	-1,5	1949	Q8BPD5	30,6	5,4
	chymotrypsinogen B	CTRB1	3,45	1830	Q9CR35	27,8	4,8
	chymotrypsinogen B	CTRB1	3,9	1836	Q9CR35	27,8	4,8
	epoxide hydrolase 2	EPHX2	-1,32	881	P34914	62,5	5,8
	pancreatic alpha-amylase	AMY2	1,39	965	P00688	57,3	7,1
	pancreatic alpha-amylase	AMY2	3,7	998	P00688	57,3	7,1
	pancreatic alpha-amylase	AMY2	2,26	2240	P00688	57,3	7,1
	pancreatic alpha-amylase	AMY2	2,53	1045	P00688	57,3	7,1
	pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP	2,88	1136	Q6P8U6	51,4	6,4
	pancreatic triacylglycerol lipase	PNLIP	3,75	1146	Q6P8U6	51,4	6,4
	serum albumin	ALB	-1,39	643	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,29	2266	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,3	2272	P07724	68,6	5,7
	trypsinogen 7	TRY	2,83	1878	Q9D7Y7	26,4	9,4

**Tabella appendice 3: Elenco delle proteine significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nelle arterie mesenteriche nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Strutturali	Dihydropyrimidinase-related protein 3	DPYSL3	1,23	876	Q62952	61,9	6
	destrin	DSTN	1,23	2126	Q9R0P5	18,5	9,2
	transgelin	SM22-alpha	1,23	2219	P37804	22,6	9,4

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Risposta allo stress	Hspa8 protein	HSPA8	-1,2	655	Q504P4	68,7	5,2
	60 kDa heat shock protein	HSPD1	-1,24	837	P63038	60,9	5,8
	protein disulfide-isomerase	PDIA	-1,44	852	P09103	57	4,6
Altre	pancreatic alpha-amylase	AMY2	-3,53	998	P00688	57,3	7,1
	chymotrypsinogen B	CTRB1	-3,02	1830	Q9CR35	27,8	4,8
	chymotrypsinogen B	CTRB1	-3,98	1836	Q9CR35	27,8	4,8
	serotransferrin	TRF	-1,47	500	Q921I1	76,7	7,2
	serotransferrin	TRF	-1,47	507	Q921I1	76,7	7,2
	serotransferrin	TRF	-1,39	514	Q921I1	76,7	7,2
	serotransferrin	TRF	-1,29	518	Q921I1	76,7	7,2
	serum albumin	ALB	-1,39	643	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,52	2266	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,26	2272	P07724	68,6	5,7

**Tabella appendice 4: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Glicolisi	Eno1 protein	ENO1	-1,37	1658	Q6PHC1	39,8	5,8
	pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	-1,22	1282	P52480	57,8	7,9
Metabolismo del piruvato	dihydrolipoamide S-acetyltransferase	DLAT	-1,89	1091	Q8BMF4	59,1	5,6
	NADP-dependent malic enzyme	ME1	-1,25	1198	P06801	63,9	7,8
	Pyruvate carboxylase	PC	-5,2	322	Q05920	129,6	6,3
	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	PDHA1	-1,36	1744	P35486	43,2	9,4



Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Ciclo di Krebs	aconitate hydratase	ACO2	-1,43	671	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	-1,42	687	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	-1,54	702	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	-1,85	705	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	-2,42	710	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	-1,94	711	Q99KI0	85,4	8,9
	dihydrolipoyl dehydrogenase	DLD	-1,62	1333	O08749	54,2	9
	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	DLST	-1,55	1496	Q9D2G2	49	9,9
	dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	DLST	-1,6	1499	Q9D2G2	49	9,9
	fumarate hydratase	FH	-1,33	1732	P97807	54,3	9,7
	fumarate hydratase	FH	-1,61	1734	P97807	54,3	9,7
	malate dehydrogenase	MDH	-1,47	2277	P14152	36,5	6,2
	Ogdh protein	OGDH	-2,21	421	Q60597	116	6,5
	Ogdh protein	OGDH	-1,93	433	Q60597	116	6,5
Catena respiratoria	ATP synthase subunit alpha	ATP5A1	-1,48	1488	Q03265	59,7	9,7
	ATP synthase subunit beta	ATP5B	-1,58	1531	P56480	56,3	5,1
	cytochrome b-c1 complex subunit 1	UQCRC1	-1,51	1699	Q9CZ13	52,8	5,8
	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	ETFDH	-1,43	1168	Q921G7	68	7,9
	Electron transferring flavoprotein, alpha polypeptide	ETFDH	-1,33	2401	Q99LC5	35	9,5
	mitochondrial ATP synthase, H <sup>+</sup> -transporting F1 complex beta subunit	ATP5B	-1,39	1519	P56480	48	4,8
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	NDUFS1	-1,73	809	Q91VD9	79,7	5,4

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Shuttle del glicerolo	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1	-1,38	2257	P13707	37,5	6,9
Beta ossidazione	3-ketoacyl-CoA thiolase	ACAA2	-1,43	1850	Q8BWT1	41,8	9,3
	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	ECH1	-1,24	2411	O35459	36,1	8,8
	long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL	-1,25	1861	P51174	47,9	9,2
	long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL	-1,62	1871	P51174	47,9	9,2
	medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADM	-1,46	1894	P45952	46,5	9,4
	medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADM	-1,48	1895	P45952	46,5	9,4
	propionyl-CoA carboxylase alpha chain	PCCA	-1,7	916	Q91ZA3	79,9	6,9
	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADS	-1,27	1985	Q07417	44,9	9,4
	very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL	-1,62	1131	P50544	70,8	9,6
	very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL	-2,64	1132	P50544	70,8	9,6
Metabolismo dei lipidi	acetyl-CoA acetyltransferase	ACAT1	-1,32	1922	Q8QZT1	44,8	9,5
Via dei pentosi	transketolase	TKT	-1,44	1066	P40142	60,5	6,6
	transketolase	TKT	-2	1067	P40142	60,5	6,6
Metabolismo degli aminoacidi	glutamate dehydrogenase 1	GLUD1	-1,52	1484	P26443	61,3	8,8
Catabolismo degli xenobiotici	Cryz protein	CRYZ	1,52	2060	P47199	35,3	9,1
	Epoxide Hydrolase	EPHX2	-1,48	1276	P34914	62,5	5,8
Altre	aldehyde dehydrogenase	ALDH2	-1,36	1518	P47738	56,5	8,6
	bisphosphate 3'-nucleotidase	BPNT1	1,37	1959	Q9Z0S1	33,1	5,5
	retinol-binding protein 1	RBP1	2,96	3272	Q00915	15,8	5

**Tabella appendice 5: Elenco delle proteine significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Biosintesi proteica	elongation factor Tu, mitochondrial isoform 1	TUFM	-1,32	1769	Q8BFR5	49,5	7,9
	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	2,74	3167	P63242	16,3	4,7
Strutturali	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	CAPZB	1,47	2485	P47757	33,7	6,0
	Gsn protein	GSN	-1,95	631	Q6PAC1	80,7	5,4
	lamin-A/C isoform A	LMNA	-1,44	948	P48678	74,2	6,6
	lamin-A/C isoform A	LMNA	-1,62	1134	P48678	74,2	6,6
	myosin	MYH	-3,86	401	O08638	223,1	5,3
	myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	1,36	3088	Q9CQ19	19,8	4,6
	rab GDP dissociation inhibitor beta	GDI2RAB GDIB	-1,43	1648	P50399	50,5	5,9
	smooth muscle gamma-actin	ACTG2	-1,66	1892	Q61852	42,9	5,3
	smooth muscle gamma-actin	ACTG2	2,96	2518	Q61852	42,9	5,3
	transgelin	SM22-alpha	1,36	3373	Q9WVA4	23,6	7,5
	tropomyosin alpha-3 chain isoform 2	TPM3	1,77	2483	Q63610	29	4,6
	tubulin beta-5 chain	TUBB5	-1,63	1440	P99024	49,6	4,6
	Tubulin, beta 2C	TBB2C	-1,53	1425	P68372	49,8	4,6
	vimentin	VIM	-1,31	1350	P20152	53,7	4,9
	vimentin	VIM	-1,26	1360	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	-1,43	1370	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	-1,64	1376	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	-1,6	1556	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	-1,39	1651	P20152	51,5	4,8

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Adesione cellulare	collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	-1,54	169	Q04857	108,4	5,1
	collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	-1,6	174	Q04857	108,4	5,1
	filamin-binding LIM protein 1	FBLIM1	1,23	1374	Q71FD7	41	6,1
	four and a half LIM domains protein 1 isoform 3	FHL1	1,2	2447	P97447	31,9	10
	galectin-1	LGALS1	2,73	3301	P16045	14,9	5,2
	phosphoglucomutase-like protein 5	PGM5	-1,29	1258	Q8BZF8	62,2	6,9
	vinculin	VCL	-6,47	243	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	-4,41	348	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	-5,2	354	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	-6,06	364	Q64727	116,6	5,7
Risposta allo stress	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	-2,13	858	P20029	72,4	4,9
	heat shock protein 65	HSP65	-1,32	1265	P63038	60,9	5,8
	heat shock protein HSP 90-beta	HSP90-beta	-2,24	656	P11499	83,2	4,8
	Hspd1 protein	HSPD1	-2,5	1269	P63038	59,4	8,9
	peroxiredoxin-2	PRDX2	1,21	2924	Q61171	21,8	5,1
	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	-1,54	1292	P27773	56,6	5,8
	stress-70 protein	HSPA9	-1,48	923	P38647	73,4	5,7
Signaling	14-3-3 protein epsilon	YWHAЕ	1,67	3371	P62260	29,1	4,4
	14-3-3 zeta	YWHAZ	1,27	2643	P63101	27,7	4,6
Altre	Anxa6 protein	ANXA6	-1,5	1043	P14824/Q99JX6	75,2	5,2
	fibrinogen beta chain	FGB	1,4	1354	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen beta chain	FGB	2,21	1431	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen beta chain	FGB	2,12	1432	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen beta chain	FGB	2,6	1441	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen beta chain	FGB	2,28	1443	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen gamma chain	FGG	1,29	1509	Q8VCM7	49,4	5,5
	serotransferrin	TRF	-1,27	775	Q92111	76,7	7,2
	serotransferrin	TRF	-1,36	3397	Q92111	76,7	7,2

Classe funzionale	Nome	Nome del gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Altre	Serpina1c protein	---	-1,49	1382	Q00896	45,6	5,2
	serum albumin	ALB	-1,41	963	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,41	1002	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,51	1004	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,67	1006	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,55	1011	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	1,3	1964	P07724	68,6	5,7

**Tabella appendice 6: Elenco delle proteine metaboliche significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, Av. ratio, numero di master, accession number, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Nome gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Glicolisi	aldolase A	ALDOA	-1,23	1999	P05064	39,6	9,4
	phosphoglycerate kinase	PGK1	-1,34	1852	P09411	44,5	8,7
	pyruvate kinase isozymes M1/M2	PKM2	1,35	1282	P52480	57,8	7,9
Metabolismo del piruvato	NADP-dependent malic enzyme	ME1	1,32	1198	P06801	63,9	7,8
	Pyruvate carboxylase	PC	5,13	322	Q05920	129,6	6,3
Ciclo di Krebs	aconitate hydratase	ACO2	1,43	710	Q99KI0	85,4	8,9
	aconitate hydratase	ACO2	1,27	711	Q99KI0	85,4	8,9
	dihydrolipoyl dehydrogenase	DLD	1,27	1333	O08749	54,2	9
	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A	-1,97	2033	Q9D6R2	39,6	6,3
	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A	-1,66	2036	Q9D6R2	39,6	6,3
	isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	IDH3A	-1,35	3368	Q9D6R2	39,6	6,3

Classe funzionale	Nome	Nome gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Catena respiratoria	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	NDUFS3	-1,27	2676	Q9DCT2	30,1	6,8
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	NDUFS1	1,37	809	Q91VD9	79,7	5,4
Shuttle del glicerolo	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1	-1,75	2251	P13707	37,5	6,9
	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	GPD1	-1,38	2257	P13707	37,5	6,9
Beta ossidazione	carnitine O-palmitoyltransferase 2	CPT2	1,31	1081	P52825	73,9	9,3
	delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase	ECH1	-1,21	2411	O35459	36,1	8,8
	long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL	-1,87	1985	P51174	47,9	9,2
	long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADL	1,48	1132	P51174	47,9	9,2
	medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADM	-1,72	1861	P45952	46,5	9,4
	propionyl-CoA carboxylase alpha chain	PCCA	1,24	916	Q91ZA3	79,9	6,9
	short-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADS	-1,24	1871	Q07417	44,9	9,4
	very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase	ACADVL	-1,27	1895	P50544	70,8	9,6
Via dei pentosi	transketolase	TKT	1,36	1067	P40142	60,5	6,6
Metabolismo degli aminoacidi	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	ALDH4A1	2,02	1203	Q8CHT0	61,8	9,2
	glutamate dehydrogenase 1	GLUD1	1,23	1484	P26443	61,3	8,8
	glutamine synthetase	GLUL	-1,23	1801	P15105	42,1	6,7
Catabolismo degli xenobiotici	Cryz protein	CRYZ	-1,45	2060	P47199	35,3	9,1
Altre	aldehyde dehydrogenase	ALDH2	1,43	1518	P47738	56,5	8,6
	carbonic anhydrase 3	CA3	1,46	3380	P16015	29,3	7,1

**Tabella appendice 7: Elenco delle proteine significativamente variate (Student T-test <0,01) identificate mediante 2D-DIGE nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, nome del gene, *Av. ratio*, numero di *master*, *accession number*, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

<b>Classe funzionale</b>	<b>Nome</b>	<b>Nome gene</b>	<b>Av. Ratio</b>	<b>N° master</b>	<b>AC number</b>	<b>MW [kDa]</b>	<b>pI</b>
Biosintesi proteica	eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	-2,03	3167	P63242	16,3	4,7
Strutturali	actin-related protein 3	ARP3	1,24	1600	Q99JY9	47,3	5,5
	alpha-cardiac actin	ACTC1	1,21	3389	P68033	41,8	5,1
	Gsn protein	GSN	1,81	631	Q6PAC1	80,7	5,4
	lamin-A/C isoform A	LMNA	1,43	948	P48678	74,2	6,6
	lamin-A/C isoform A	LMNA	1,71	1134	P48678	74,2	6,6
	lamin-A/C isoform C	LMNC	1,36	1195	P48678	65,4	6,4
	myosin	MYH	3,53	401	O08638	223,1	5,3
	rab GDP dissociation inhibitor alpha	GDI1	1,38	1221	P50396	50,5	4,8
	smooth muscle gamma-actin	ACTG2	-1,9	2518	Q61852	42,9	5,3
	smooth-muscle alpha tropomyosin	TPM	1,21	3394	P04692	32,7	4,6
	Tpm2 protein	TPM2	1,22	3395	P58774/Q91VH3	34,8	5,1
	transgelin	SM22-alpha	1,74	3376	P37804	22,6	9,4
	Tubulin, beta 2C	TBB2C	1,28	1425	P68372	49,8	4,6
	Tubulin, beta 2C	TBB2C	1,41	1440	P68372	49,8	4,6
	vimentin	VIM	1,31	1370	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	1,25	1376	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	1,53	1556	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	1,51	1651	P20152	51,5	4,8
	vimentin	VIM	1,84	1778	P20152	51,5	4,8

Classe funzionale	Nome	Nome gene	Av. Ratio	N° master	AC number	MW [kDa]	pI
Adesione cellulare	collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	1,9	169	Q04857	108,4	5,1
	collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	2	174	Q04857	108,4	5,1
	collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	2,24	190	Q04857	108,4	5,1
	fibulin-5	FBLN5	1,27	1012	Q9WVH9	50,2	4,4
	filamin-binding LIM protein 1	FBLIM1	1,52	1374	Q71FD7	41	6,1
	galectin-1	LGALS1	-1,66	3301	P16045	14,9	5,2
	vinculin	VCL	5,07	243	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	3,17	348	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	3,87	354	Q64727	116,6	5,7
	vinculin	VCL	4,52	364	Q64727	116,6	5,7
Risposta allo stress	78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	1,89	858	P20029	72,4	4,9
	heat shock protein HSP 90-beta	HSP90-beta	2,34	656	P11499	83,2	4,8
	Hspdp1 protein	HSPD1	1,69	1269	P63038	59,4	8,9
	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	-1,23	3216	P17742	18	9,1
	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1,38	1292	P27773	56,6	5,8
	protein disulfide-isomerase A3	PDIA3	1,21	1297	P27773	56,6	5,8
	stress-70 protein	HSPA9	-1,21	923	P38647	73,4	5,7
Altre	alpha-2-macroglobulin	A2M	-1,42	2135	Q61838	165,7	6,2
	Anxa6 protein	ANXA6	1,23	1043	P14824	75,2	5,2
	apolipoprotein A-I preproprotein	APOA1	-1,24	2828	Q00623	30,6	5,4
	chloride intracellular channel protein 1	CLIC1	-1,35	2548	Q9Z1Q5	27	4,9
	fibrinogen beta chain	FGB	3,31	1354	Q8K0E8	54,7	6,8
	fibrinogen beta chain	FGB	1,8	1441	Q8K0E8	54,7	6,8
	serotransferrin	TRF	-1,32	754	Q921I1	76,7	7,2
	serotransferrin	TRF	-1,23	768	Q921I1	76,7	7,2
	Serpina1c protein		1,34	1382	Q00896	45,6	5,2
	serum albumin	ALB	1,34	963	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,28	977	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,22	1005	P07724	68,6	5,7
	serum albumin	ALB	-1,39	1964	P07724	68,6	5,7



**Tabella appendice 8: Elenco delle proteine variate identificate mediante ICPL nell'aorta nel confronto tra topi E1KO vs topi C57 con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, mediana, AC name, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

<b>Classe funzionale</b>	<b>Nome</b>	<b>Mediana</b>	<b>AC name</b>	<b>MW [kDa]</b>	<b>pI</b>
Metabolismo	Aconitate hydratase	3,2	ACON_MOUSE	85,4	8,9
	Fatty acid synthase	2,3	FAS_MOUSE	272,3	6,1
	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	0,6	F16P2_MOUSE	36,9	5,8
	Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2	0,4	UQCR2_MOUSE	48,2	9,7
Strutturali	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	2,7	ACTA_MOUSE	42	5,1
	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	2,9	ACTB_MOUSE	41,7	5,2
	Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)	2,2	ACTG_MOUSE	41,8	5,2
	Destrin	2,5	DEST_MOUSE	18,5	9,2
	Myosin-9	1,8	MYH9_MOUSE	226,2	5,4
	Myosin-XVIIIa	0,6	MY18A_MOUSE	232,6	5,9
	Vimentin	2,2	VIME_MOUSE	53,7	4,9
Adesione cellulare	Collagen alpha-1(I) chain	1,8	CO1A1_MOUSE	137,9	5,6
	Collagen alpha-2(I) chain	3,3	CO1A2_MOUSE	129,5	9,9
	Vinculin	1,7	VINC_MOUSE	116,6	5,7
Risposta allo stress	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	8,6	SODE_MOUSE	27,4	6,4
	Glutathione S-transferase Mu 1	2,4	GSTM1_MOUSE	26	8,7
	Serine/threonine-protein kinase SMG1	0,2	SMG1_MOUSE	409,5	6
	Heat-shock protein beta-1	2,3	HSPB1_MOUSE	23	6,1

Classe funzionale	Nome	Mediana	AC name	MW [kDa]	pI
Regolazione DNA	Histone H3.1	1,9	H31_MOUSE	15,4	11,9
	Histone H3.3	2,1	H33_MOUSE	15,3	11,9
	Structural maintenance of chromosomes protein 1A	1,9	SMC1A_MOUSE	143,1	7,3
Altre	Centrosomal protein Cep290	0,4	CE290_MOUSE	288,9	5,8
	Protein phosphatase 2C isoform epsilon	10	PP2CL_MOUSE	41	5,6
	Ubiquitin	4,3	UBIQ_MOUSE	8,6	7,6

**Tabella appendice 9: Elenco delle proteine variate identificate mediante ICPL nell'aorta nel confronto tra topi flox-flox vs topi wt con rispettiva classe funzionale di appartenenza, nome, mediana, AC name, il peso molecolare apparente (MW), il punto isoelettrico (pI).**

Classe funzionale	Nome	Mediana	AC name	MW [kDa]	pI
Metabolismo	Alpha-enolase	1,9	ENOA_MOUSE	47,1	6,4
	Pyruvate kinase isozyme M2	3,4	KPYM_MOUSE	57,9	7,9
Strutturali	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)	2,3	ACTA_MOUSE	42	5,1
	Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)	1,7	ACTB_MOUSE	41,7	5,2
	Desmin	3,1	DESM_MOUSE	53,5	5,1
	Destrin	2,6	DEST_MOUSE	18,5	9,2
	Moesin	2,5	MOES_MOUSE	67,7	6,2
	Myosin light polypeptide 6	1,8	MYL6_MOUSE	16,9	4,4
	Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle isoform	2,2	MLRN_MOUSE	19,8	4,6
	Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha)	1,7	TAGL_MOUSE	22,6	9,4
	Tropomyosin alpha-4 chain	0,5	TPM4_MOUSE	28,5	4,5
	Vimentin	4,2	VIME_MOUSE	53,7	4,9

Classe funzionale	Nome	Mediana	AC name	MW [kDa]	pI
Adesione cellulare	Collagen alpha-1(I) chain	2,2	CO1A1_MOUSE	137,9	5,6
	Filamin-A	1,9	FLNA_MOUSE	281	5,6
Risposta allo stress	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	0,6	SODE_MOUSE	27,4	6,4
	Serine/threonine-protein kinase SMG1	0,3	SMG1_MOUSE	409,5	6
Regolazione DNA	Histone H2A type 2-A	1,9	H2A2A_MOUSE	14,1	11,4
	Histone H3.3	2,0	H33_MOUSE	15,3	11,9
	Histone H4	2,9	H4_MOUSE	11,4	11,8
	Methyl-CpG-binding protein 2	29,4	MECP2_MOUSE	52,3	10,5
Ribosomali	40S ribosomal protein S3a	3,3	RS3A_MOUSE	29,9	10,4
	Probable rRNA-processing protein EBP2	0,4	EBP2_MOUSE	34,7	10,6
Altre	Annexin A2	1,7	ANXA2_MOUSE	38,7	8,5
	Charged multivesicular body protein 3	0,3	CHMP3_MOUSE	25,2	4,9
	Polymerase I and transcript release factor	1,6	PTRF_MOUSE	43,9	5,3
	Protein phosphatase 2C isoform epsilon	9,7	PP2CL_MOUSE	41	5,6
	Serum albumin	2,2	ALBU_MOUSE	68,6	5,7

**Tabella appendice 10: Elenco delle proteine identificate mediante 2D-DIGE i cui geni presentano siti di legame arricchiti per i fattori di trascrizione SRF e KLF4.**

Modello	Fattore di trascrizione	Nome proteina
E1KO proteine aumentate	Klf4	14-3-3 zeta
		bisphosphate 3'-nucleotidase
		capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta
		eukaryotic translation initiation factor 5A
		fibrinogen beta chain
		fibrinogen gamma chain
		filamin-binding LIM protein 1

Modello	Fattore di trascrizione	Nome proteina
E1KO proteine aumentate	Klf4	four and a half LIM domains protein 1 isoform 3
		galectin-1
		peroxiredoxin-2
		serum albumin
		transgelin
flox-flox proteine diminuite	Klf4	aldolase A
		alpha-2-macroglobulin
		chloride intracellular channel protein 1
		delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase
		eukaryotic translation initiation factor 5A
		galectin-1
		glycerol-3-phosphate dehydrogenase
		NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3
		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
		peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
		serum albumin
flox-flox proteine aumentate	SRF	actin-related protein 3
		alpha-cardiac actin
		Anxa6 protein
		carbonic anhydrase 3
		fibulin-5
		transgelin
		vinculin
	Klf4	78 kDa glucose-regulated protein
		aconitate hydratase
		actin-related protein 3
		aldehyde dehydrogenase
		alpha-cardiac actin
		Anxa6 protein
		carbonic anhydrase 3
		carnitine O-palmitoyltransferase 2
		delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase
		fibrinogen beta chain
		fibulin-5

Modello	Fattore di trascrizione	Nome proteina
flox-flox proteine aumentate	Klf4	filamin-binding LIM protein 1
		glutamate dehydrogenase 1
		Gsn protein
		heat shock protein HSP 90-beta
		Hspd1 protein
		lamin-A/C isoform C
		long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase
		NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit
		propionyl-CoA carboxylase alpha chain
		protein disulfide-isomerase A3
		pyruvate kinase isozymes M1/M2
		rab GDP dissociation inhibitor alpha
		serum albumin
		Tpm2 protein
		transgelin
		Tubulin, beta 2C
		vimentin
		vinculin

**Tabella appendice 11: Elenco delle proteine identificate mediante ICPL i cui geni presentano siti di legame arricchiti per i fattori di trascrizione SRF e KLF4.**

Modello	Fattore di trascrizione	Nome proteina
E1KO proteine diminuite	Klf4	Centrosomal protein Cep290
		Myosin-XVIIIa
		Serine/threonine-protein kinase SMG1
		Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2
E1KO proteine aumentate	SRF	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)
		Actin, cytoplasmic 2 (Gamma-actin)
		Myosin-9
		Vinculin

Modello	Fattore di trascrizione	Nome proteina
flox proteine aumentate	SRF	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)
		Filamin-A
		Myosin light polypeptide 6
		Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha)
	Klf4	Actin, aortic smooth muscle (Alpha-actin-2)
		Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)
		Alpha-enolase
		Annexin A2
		Collagen alpha-1(I) chain
		Desmin
		Destrin
		Filamin-A
		Histone H2A type 2-A
		Histone H3.3
		Histone H4
		Methyl-CpG-binding protein 2
		Moesin
		Myosin light polypeptide 6
		Polymerase I and transcript release factor
		Protein phosphatase 2C isoform epsilon
		Pyruvate kinase isozyme M2
		Serum albumin
		Transgelin (Smooth muscle protein 22-alpha)
		Vimentin

## 12. PRODOTTI SCIENTIFICI DEL DOTTORANDO

### **Contributo a convegno (Poster):**

L. Barbalini, M. Vasso, D. Capitanio, A. Viganò, D. Bizzotto, F. Da Ros, G. Bressan, P. Braghetta, C. Gelfi. "*Extracellular matrix alterations in hypertension: effects of Emilin1 deficiency in mouse aorta*" Presentato al "Joint meeting ESH-ISH Hypertension Athens 2014", Atene, 13-16 giugno 2014.

Laura Barbalini, Daniele Capitanio, Michele Vasso, Antonia Ratti, Vincenzo Silani, Cecilia Gelfi. "*Muscle molecular signature in sporadic ALS patients*". Presentato al 7th ItPA Annual National Conference, Viterbo, 12-15 Giugno 2012.

*Il manoscritto relativo a questa tesi di dottorato è in fase di stesura.*





### 13. RINGRAZIAMENTI

*Questo lavoro è stato possibile grazie:*

- *alla Prof.ssa Cecilia Gelfi che mi ha permesso di seguire questo progetto nel suo laboratorio in collaborazione con l'Università degli Studi di Padova, dove sono stati realizzati i modelli animali;*
- *alla Scuola di Dottorato di Medicina Molecolare;*
- *ai miei colleghi, Daniele Capitanio, Michele Vasso, Agnese Viganò, Roberta Leone, Manuela Moriggi, Sara De Palma, Enrica Torretta e Chiara Fania. Vi ringrazio per i consigli e per la compagnia.*

*Quello che ho imparato in questi anni di dottorato mi ha accompagnato dentro e fuori dal laboratorio, mi ha guidato verso nuovi obiettivi. Per questo ringrazio chi mi è stato vicino e mi ha indicato la strada.*